

# 活性氧调节单核细胞增生李斯特菌菌膜形成

张超, 陈国薇, 杨玉萍, 吴淑燕, 刘箐\*  
(上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

**摘要:** 通过使用可抑制还原型辅酶 II (NADPH) 氧化酶活性、降低细胞内源性活性氧(ROS)的抑制剂二苯基碘(DPI), 以及用抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)2种方法降低单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)中ROS的产生, 同时用外源补充H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的办法来验证ROS对LM菌膜(BF)形成的调控作用。结果表明: DPI和NAC能够通过降低ROS的产生进而抑制LM菌膜的生成, 细菌中外源补充活性氧(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)对BF的生成有一定的促进作用。此研究说明, 和高等动植物一样, LM中也存在类似于负责产生ROS的NADPH氧化酶, 由其介导产生的ROS对LM的BF形成不可或缺, ROS可能是BF形成过程中重要的信号分子。

**关键词:** 活性氧; 单核细胞增生李斯特菌; 菌膜

## Reactive Oxygen Species (ROS) Regulates *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation

ZHANG Chao, CHEN Guo-wei, YANG Yu-ping, WU Shu-yan, LIU Qing\*

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

**Abstract:** In order to explore the role of ROS (reactive oxygen species) in *Listeria monocytogenes* (LM) biofilm formation, we added either diphenyleiiodonium chloride (DPI) as a NADPH oxidase inhibitor or N-acetylcysteine (NAC) as an antioxidant in combination with exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to observe the changes of ROS and biofilm formation. The results showed that both DPI and NAC were able to restrain the biofilm formation of LM by reducing the amount of ROS generation. To some extent, the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> could promote biofilm formation. Our results suggest that NADPH oxidase exists in LM, which is responsible for generating ROS. ROS plays a vital role in LM biofilm formation and may be an important signal molecule.

**Key words:** reactive oxygen species (ROS); *Listeria monocytogenes*; biofilm

中图分类号: Q932

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0189-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323040

菌膜(biofilm, BF)是细菌在自然界中一种抗逆生存方式, 在遇到营养、温度、酸碱等不良生存环境后, 首先通过细菌内部通信机制形成聚集, 之后在聚集体表面形成以多糖、蛋白等为主的立体膜样物<sup>[1-2]</sup>。与浮游菌相比, 处于菌膜状态下的细菌对消毒剂和光、热等具有更高的抗性, 因此在食品生产加工行业, 以BF形式存在的食源性致病菌是食品主要微生物污染源并成为严重的公共卫生安全问题<sup>[3-4]</sup>。

单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM)属于李斯特菌属, 为革兰氏阳性兼性厌氧菌, 能够引起多种人畜共患病, 是公认的危害严重的食源性致病菌之一<sup>[5]</sup>。感染LM后容易造成孕妇死产、流产、脑膜炎和胃肠道疾病等, LM所引起的死亡率高达20%~30%<sup>[6]</sup>。研究表明, LM能够产生BF从而黏附在食品生产加工设备和

某些动物源性食品上<sup>[4]</sup>, 是LM污染和传播的重要来源。LM是BF形成机理研究的模式致病菌, 但研究主要集中在PrfA、ActA、SigmaB基因和ABC转运蛋白等已知毒力因子方面<sup>[7-10]</sup>, 对于ROS在BF形成中的作用研究较少<sup>[11-13]</sup>。NADPH氧化酶是动植物细胞中专门产生ROS最重要的酶之一, 该酶由gp91phox、p22phox、p40phox、p47phox和p67phox5个亚基组成, NADPH氧化酶对多种环境胁迫敏感并可被瞬时激活, 由其介导产生的ROS参与多种细胞信号转导及基因表达调控<sup>[14]</sup>, 由NADPH氧化酶介导产生的内源性ROS主要包括超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>·), 羟自由基(·OH), 过氧化物(RO<sub>2</sub>·), 烷氧基(RO·), 以及O<sub>2</sub>衍生的非自由基物种如过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)<sup>[15]</sup>。大量研究表明, 由NADPH氧化酶介导产生的ROS是高等动植物基因表达调控的重要信号分子<sup>[16-18]</sup>。

收稿日期: 2013-07-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371776)

作者简介: 张超(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食源性致病菌致病机理。E-mail: cc\_zhang213@163.com

\*通信作者: 刘箐(1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食源性致病菌致病机理及安全控制。E-mail: liuq@usst.edu.cn

有研究表明,细菌BF形成中通常会伴随活性氧(ROS)的产生,但其对BF形成的影响尚无定论甚至相互矛盾,例如吸烟在促进呼吸道感染病灶中金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)ROS升高的同时上调了BF形成相关基因的表达<sup>[11]</sup>,过量Fe<sup>3+</sup>诱导铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)产生BF和ROS<sup>[12]</sup>,金黄色葡萄球菌形成BF的过程中发现ROS升高<sup>[13]</sup>等;也有研究发现在超氧化物歧化酶(SOD)缺失的LM细胞株LM- $\Delta$  sod中,BF的形成显著降低<sup>[8]</sup>。但是,在BF形成过程中,ROS究竟是胁迫环境下的副产物阻止BF的形成,还是BF形成中不可或缺的信号分子?细菌中是否也存在和高等动植物一样,具有专门产生ROS以传递信号的NADPH氧化酶?关于这些问题至今国内外并无相关报道。为此,本研究以细菌中NADPH氧化酶介导产生的ROS为主要研究靶点,通过减少LM中ROS的产生来观察BF形成的变化,初步探讨ROS在LM菌膜形成中的作用,以寻求食品加工、运输过程中BF污染的有效控制途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与试剂

#### 1.1.1 菌株

单核细胞增生李斯特菌株(ATCC 43251)由上海慧耘生物科技有限公司惠赠;英诺克李斯特菌株(CICC 10297)购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

#### 1.1.2 试剂

脑心浸液培养基(BHI) 北京陆桥技术有限责任公司;二苯基氯化碘盐(DPI)、2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA) 美国Sigma公司;N-乙酰半胱氨酸(NAC) 国药集团化学试剂有限公司;4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI) 美国Vector Laboratories公司;四甲基偶氮唑盐(MTT) 碧云天生物技术公司。

### 1.2 仪器与设备

SpectraMax M2多功能酶标仪 美国分子仪器公司;Nikon A1激光扫描共聚焦显微镜(CLSM) 日本尼康公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 活性氧的测定

用接种环挑取LM单菌落接种于灭菌脑心浸液(BHI)液体培养基中,37℃条件下静止培养过夜。然后用新鲜的BHI培养基将菌液稀释到OD<sub>600nm</sub>为0.3。取1mL菌液分别加入终浓度为0、0.5、1、5、10 $\mu$ mol/L的DPI,用无害李斯特菌(LI)做对照,37℃条件下静置1h后离心(8000r/min,6min),用PBS(pH7.4)清洗3次后重悬,吸取重悬菌液100 $\mu$ L添加到96孔细胞培养板中,每个样品设8个平行,用酶标仪检测每孔初始OD<sub>600nm</sub>以检测细菌的初始浓度。将培养板于37℃条件下静置培养。24h后用酶标仪检测

培养板中菌液的增殖状况(OD<sub>600nm</sub>)和荧光值(激发光波长488nm,发射光波长530nm。下同),再向每个孔中添加20 $\mu$ mol/L的DCFH-DA,密封后置于37℃,注意避光。30min后用酶标仪检测每孔菌液的荧光值<sup>[9]</sup>。DCFH-DA本身没有荧光,但是它可以穿透细胞膜,进入到细胞内后被细胞内的酯酶水解生成DCFH,而细胞内的ROS将无荧光的DCFH氧化生成有荧光的DCF,因此检测DCF的荧光可间接反映细胞内ROS的水平。

#### 1.3.2 菌膜的测定

用定量和定性两种方法测定BF。定量测定BF中,首先参照步骤1.3.1节进行细菌前处理,培养24h后弃去上层培养基,用无菌蒸馏水洗涤3次,室温静置45min。然后向每孔中加入100 $\mu$ L 1g/100mL的结晶紫溶液,染色45min。用无菌蒸馏水洗涤3次并室温静置干燥,再向每孔加入110 $\mu$ L体积分数95%的乙醇溶液,脱色45min后用酶标仪检测此时的OD<sub>570nm</sub><sup>[19]</sup>。

在定性检测BF中,吸取1mL用同样方法前处理的菌液,加到含有细胞培养片的12孔细胞培养板中,置于37℃条件下反应24h后,用无菌蒸馏水洗涤3次,室温静置45min后用DAPI染液封片,然后用激光扫描共聚焦显微镜观察BF形态。

#### 1.3.3 细胞增殖及活性的测定

前处理步骤参照1.3.1节,24h后测量细菌浓度(OD<sub>600nm</sub>)以确定细菌的增殖状况,之后向每孔添加20 $\mu$ L 5mg/mL的MTT,密封后置于37℃条件下反应4h后离心(4000r/min,10min),小心弃去上层液体,每孔添加150 $\mu$ L的二甲亚砷(DMSO),振荡溶解蓝色结晶,在570nm波长处测量各孔光密度。该MTT方法可确定细菌自身的活性,这是因为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性MTT还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓩并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。DMSO能溶解细胞中的甲瓩,用多功能酶标仪在570nm波长处测定其光吸收值,可间接反映细胞活性。

#### 1.3.4 NAC对活性氧和菌膜的影响测定

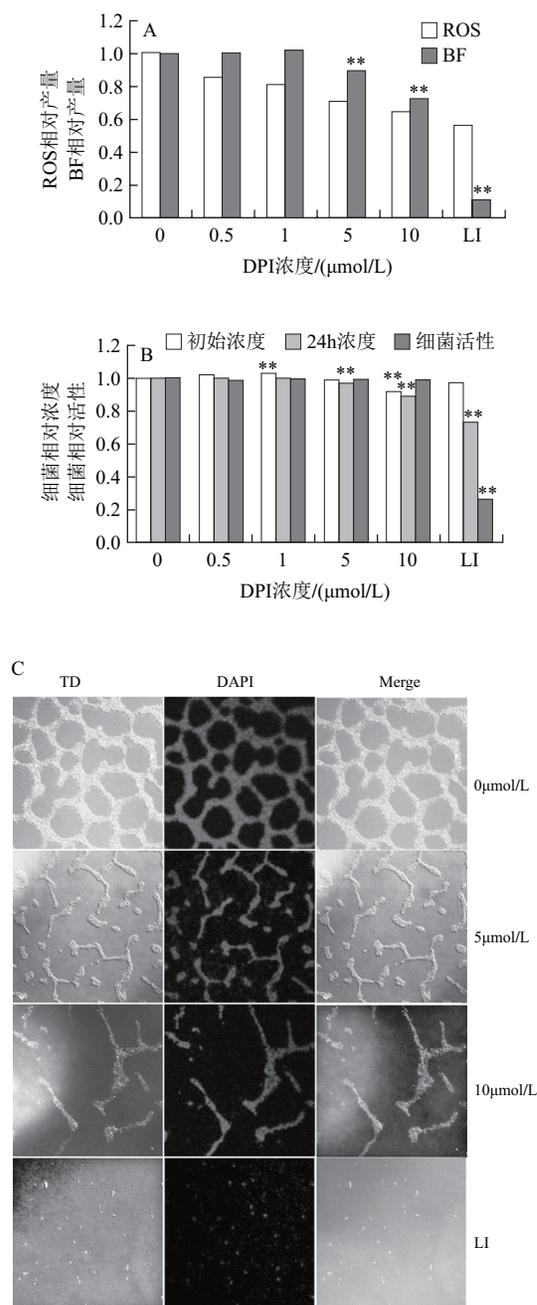
用LM单菌落接种增菌后稀释到OD<sub>600nm</sub>为0.3,取1mL菌液分别加入终浓度为0、0.01、0.1、1mmol/L的NAC,混匀后每孔100 $\mu$ L添加到96孔细胞培养板中,设8个平行,密封后静置于37℃。24h后添加DCFH-DA测量ROS的产生,然后进行染色、脱色。实验过程中依次测量细菌生长状况(OD<sub>600nm</sub>)、荧光强度和菌膜含量(OD<sub>570nm</sub>),并用MTT实验检测细菌增殖及活性。

#### 1.3.5 外源补充H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对菌膜形成的影响

向OD<sub>600nm</sub>为0.3的LM中添加终浓度为0、0.01、0.1、1、10、100 $\mu$ mol/L的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,静置于37℃条件下反应24、48、72h后添加DCFH-DA,再反应30min后进行染色、脱色。实验过程中依次测量细菌生长状况(OD<sub>600nm</sub>)、荧光强度和菌膜含量(OD<sub>570nm</sub>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 普通培养条件下DPI对LM活性氧产生和菌膜形成的影响



A、B.以未添加DPI一组测定值作为对照，将其值设定为“1”；  
C. 0、5、10μmol/L DPI处理的LM和LI形成的菌膜共聚焦显微镜图片(×60)：TD. 透射白光观察到的BF；DAPI. DAPI染液染色后观察到呈现蓝色荧光的BF；Merge.将2种观察方式叠加在一起得到的菌膜形态图；\*\*.与0μmol/L DPI处理组相比差异极显著。下同。

**图1 普通培养条件下DPI对单核细胞增生李斯特菌的活性氧和菌膜形成的影响**

**Fig.1 Effect of DPI on ROS and biofilm formation of *L. monocytogene* under common culture conditions**

普通培养条件即将细菌放置于最适生长温度37℃条件下，不施加外源胁迫条件使其在细胞培养板中生长并形成菌膜。由图1A可知，不同浓度DPI处理的LM培养24h后，随着DPI处理浓度的增加，ROS、BF形成均呈现降低趋势。其中5、10μmol/L的DPI处理后，ROS比0μmol/L的DPI处理分别降低30%和37%，与此同时，BF的形成分别降低11%和28%，但0.5、1μmol/L DPI处理下的LM所产生的BF含量与未处理的LM相比无明显差异，虽然在这两个浓度下，ROS的产生仍然分别降低了15%和20%。作为BF形成阴性对照的LI的ROS和BF形成均处于较低水平。

为排除LM浓度和细菌活性对其产生ROS和BF的影响，在测定ROS和BF的同时，分别检测LM初始浓度、DPI处理后培养24h后浓度，以及DPI处理后生长24h的细菌活性。由图1B可知，0、0.5、5μmol/L的DPI处理的LM的初始细菌浓度无明显差异，但10μmol/L的DPI处理后LM的增殖有一定的降低，但MTT结果显示细菌活性并无明显变化，表明不同浓度的DPI处理对LM的增殖及活性无明显影响。

用激光扫描共聚焦显微镜观察BF的形成，结果如图1C所示，0、5、10μmol/L的DPI处理后LM均形成了交联网状结构的BF，但随着DPI处理浓度的增加网状结构的孔隙逐渐增加，说明菌膜形成降低，无侵袭力的LI没有形成明显的网状结构，只有一些分散的细菌，说明其形成BF的能力很弱。

### 2.2 高温下DPI对LM的活性氧的产生和菌膜形成的影响

菌膜菌在不利的环境中生长时可以通过产生菌膜来确保自身的生存，实验过程中通过提高培养温度给LM提供一个外在的温度胁迫，以观察在此条件下LM所产生ROS和BF之间的关系。由图2A可知，BF在不同浓度的DPI处理1h后，置于50℃高温下培养24h后，LM产生的ROS随着DPI浓度的升高而降低，但和普通培养条件不同的是，伴随着ROS形成量的降低，只有10μmol/L的DPI处理的LM菌膜的形成降低约8%，其他处理的LM产生的菌膜无明显变化。由图2B可知，10μmol/L DPI处理的LM初始浓度、24h浓度和细菌活性均发生了显著的降低。图2C是LM和LI形成的BF的共聚焦显微图片。不同浓度DPI处理后LM均形成了致密的交联网状结构，但与0μmol/L DPI处理的LM相比，10μmol/L DPI处理的LM形成的BF网状结构孔隙增加，BF形成降低。而LI只显示一些分散的细菌，观测不到交联状的菌膜结构，形成BF的能力很弱。

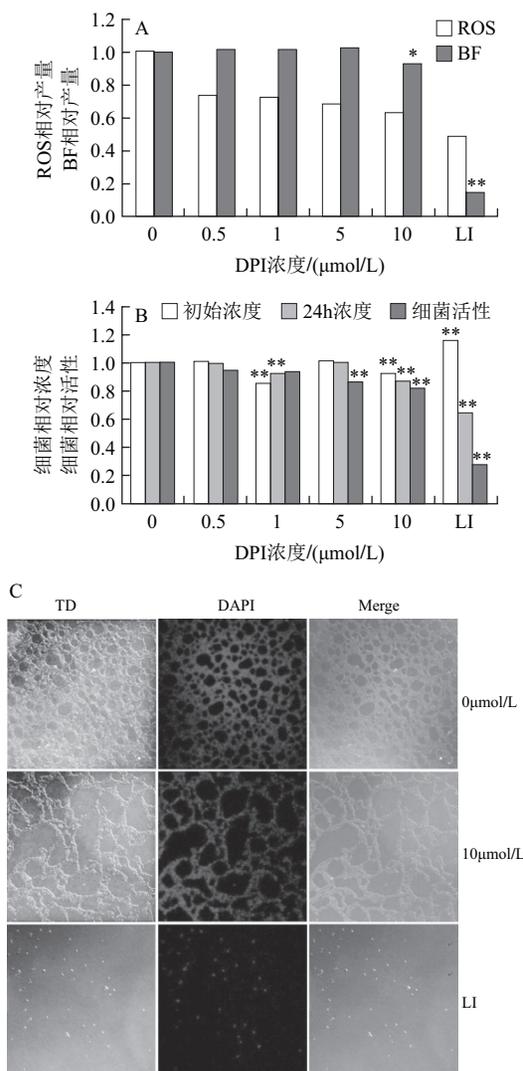


图2 50℃条件下DPI对单核细胞增生李斯特菌的活性氧和菌膜形成的影响

Fig.2 Effect of DPI on ROS and biofilm formation of *L. monocytogene* at 50 °C

### 2.3 NAC对LM的活性氧和菌膜形成的影响

NAC是一种抗氧化剂,实验过程中通过添加NAC来降低LM产生的ROS,以观察在此条件下BF的表达量所发生的变化。用不同浓度的NAC和LM共培养24h后,测定相应处理的ROS及BF形成。由图3A可知,不同浓度的NAC均降低了LM中ROS的生成量。100、1000 $\mu\text{mol/L}$ 的NAC处理后,ROS比0 $\mu\text{mol/L}$ 的NAC处理分别降低18%和17%,同时BF的形成分别降低15%和13%,但10 $\mu\text{mol/L}$  NAC处理下的LM所产生的菌膜含量与未处理的LM相比无明显差异,虽然在此浓度下,ROS的产生仍然降低了15%。作为BF形成阴性对照的LI,相应ROS和BF形成均处于较低水平。由图3B可知,LM的初始细菌浓度、共培养24h后细菌浓度、细菌活性均没有明显的差异,虽然1000 $\mu\text{mol/L}$  NAC处理的LM细菌活性与其他处

理相比有显著的升高,但是相应菌膜的抑制效果依旧显著。此结果表明NAC能够通过降低细菌产生的ROS进而降低菌膜的形成,进一步说明LM中的ROS在BF的形成中必不可少。

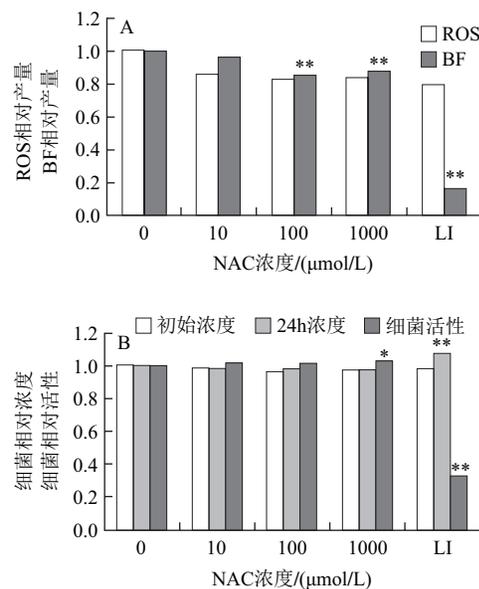


图3 NAC对单核细胞增生李斯特菌的活性氧和菌膜形成的影响

Fig.3 Effect of NAC on ROS and biofilm formation of *L. monocytogene*

### 2.4 外源性 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对BF形成的影响

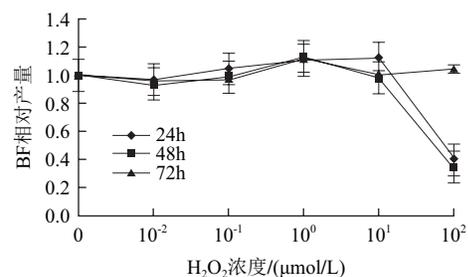


图4 补充 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对单核细胞增生李斯特菌菌膜形成的影响

Fig.4 Effect of exogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$  on biofilm formation of *L. monocytogene*

为了进一步验证ROS对BF形成的影响,将不同浓度的 $\text{H}_2\text{O}_2$ (ROS的主要成员)补充到LM培养液中,观察是否会对菌膜的产生造成影响。由图4可知,在共培养24、48、72h3个时间段后,0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对LM的BF形成均有一定的促进作用,BF形成增加最高达到8%,但在 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的浓度达到100 $\mu\text{mol/L}$ 后,BF形成明显降低,由此说明,适当浓度的ROS对BF的形成具有重要的促进作用,而高浓度的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 可能降低LM形成BF的能力。

## 3 结论

本研究证实,LM中有类似于高等动植物的NADPH氧化酶,且由其介导产生的ROS是LM形成BF的必要条

件；抗氧化剂可显著抑制LM的形成，而外源补充H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可促进LM菌膜的形成，进一步说明ROS对BF形成的重要调控作用。

已有大量的研究证实，适量的ROS是高等动植物所必需的信号分子，参与几乎所有细胞的正常生理活动，敲除NADPH氧化酶或者过度清除细胞中的ROS，均对细胞的存活产生直接的影响<sup>[16-18]</sup>。作为低等生物的细菌，其正常生理活动，是否同样受ROS的调控，是否也有同样产生ROS的酶系？这一问题近年来逐渐引起研究者的兴趣，但大多数研究认为，ROS是细菌生理活动中产生的副产品，可产生氧化损伤进而影响细菌的正常生理活动。本研究从细菌内部产生ROS的酶系入手，探讨了内源性产生ROS在BF形成中的作用，首次提出ROS可促进BF形成的观点，是ROS与BF形成关系的重要补充，但值得特别指出的是，虽然使用了高等动植物中NADPH氧化酶的抑制剂DPI，也取得了和高等动植物一样的ROS抑制效果，但是迄今为止，LM等多数细菌中专门产生ROS的NADPH氧化酶，其基因、蛋白结构信息仍然未知，这是未来该领域的重点研究方向。

虽然NADPH氧化酶是细胞内ROS的重要来源，但可能不是唯一来源。当DPI抑制了NADPH氧化酶的活性时，可能还存在其他途径对ROS的补充。同时，还存在许多其他的基因具有调节菌膜形成的潜在能力。因此实验过程中添加DPI和NAC后虽然能够降低LM活性氧的含量，但是并不是所有处理浓度下BF的形成均受到了抑制。在外源补充ROS(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)实验中，一方面细菌要对这种外源氧化压力做出应答，另一方面细菌本身也在不断产生和消耗ROS，但总体来看外加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对LM菌膜的形成在一定程度上有促进作用。Cugini等<sup>[20]</sup>也发现在*IasR*基因缺失的铜绿假单胞菌突变株中，通过添加外源H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>能够恢复Δ*IasR*突变体中的群体感应和BF生成能力。以上研究说明细菌内的ROS可能具有和动植物细胞中ROS一样的“信号分子”功能。

综上所述，ROS在LM菌膜形成过程中具有重要的作用，可能是潜在的BF形成调控“信号分子”。这一观点为研究LM的致病机理提供了新思路，以便更好的解决食品生产加工运输过程中的LM污染问题。通过构建NADPH氧化酶缺失菌株来观察对LM菌膜表达的影响，进一步研究LM菌膜形成的机制将是今后研究的主要内容。

#### 参考文献：

- [1] COSTERTON J W, PHILIP S S, GREENBERG E P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999, 284: 1318-1322.
- [2] 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.
- [3] NORWOOD D E, GILMOUR A. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88(3): 512-520.
- [4] EDMUND A Z, KYLE C S. Microbial biofilms in the food processing industry: should they be a concern?[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1994, 23(2): 125-148.
- [5] ACHESON D, EDITOR S. Foodborne listeriosis[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2000, 31(3): 770-775.
- [6] ROCOURT J, JACQUET C, REILLY A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 62(3): 197-209.
- [7] TRAVIER L, GUADAGNINI S, GOUIN E, et al. ActA promotes *Listeria monocytogenes* aggregation intestinal colonization and carriage[J]. *PloS Pathogens*, 2013, 9(1): e1003131.
- [8] SUO Yujuan, HUANG Yanyan, LIU Yanhong, et al. The Expression of superoxide dismutase (SOD) and a putative ABC transporter permease is inversely correlated during biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b G[J]. *PloS One*, 2012, 7(10): e48467.
- [9] 冯飞飞, 张强, 王莉, 等. 毒力基因调控蛋白PrfA 促进单核细胞增生李斯特菌生物被膜的形成[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(9): 1450-1457.
- [10] 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.
- [11] KULKARNI R, ANTALA S, WANG A, et al. Cigarette smoke increases *Staphylococcus aureus* biofilm formation via oxidative stress[J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(11): 3804-3811.
- [12] BERLUTTI F, MOREA C, BATTISTONI A, et al. Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*[J]. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 2005, 18(4): 661-670.
- [13] ARCEMIRANDA J E, SOTOMAYOR C E, ALBESA I, et al. Oxidative and nitrosative stress in *Staphylococcus aureus* biofilm[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2011, 315(1): 23-29.
- [14] 韩晓燕, 高丽萍, 刘箬. NOX家族蛋白的研究进展[J]. *生命科学*, 2012, 24(6): 568-577.
- [15] MOBARAK A M, BILLION A, WALID M, et al. Adaptation of *Listeria monocytogenes* to oxidative and nitrosative stress in IFN-γ-activated macrophages[J]. *International Journal of Medical Microbiology*, 2011, 301(7): 547-555.
- [16] AHNMAD P, SARWAT M, SHARMA S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants[J]. *Journal of Plant Biology*, 2008, 51(3): 167-173.
- [17] KRESLAVSKI V D, LOS D A, ALLAKHVERDIEV S I, et al. Signaling role of reactive oxygen species in plants under stress[J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2012, 59(2): 141-154.
- [18] MATSUNAGA Y, KAWAI Y, KOHDA Y, et al. Involvement of activation of NADPH oxidase and extracellular signal-regulated kinase(ERK) in renal cell injury induced by zinc[J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2005, 30(2): 135-144.
- [19] DJORDJEVIC D, WIEDMANN M, MCLANDSBOROUGH L A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 2950-2958.
- [20] CUGINI C, MORALES D K, HOGAN D A. *Candida albicans*-produced farnesol stimulates *Pseudomonas* quinolone signal production in LasR-defective *Pseudomonas aeruginosa* strains[J]. *Microbiology*, 2010, 156(10): 3096-3107.