

单核细胞增生李斯特菌 *luxS* 基因对该菌环境适应性的影响

王佳雨¹, 曹青¹, 张坤中², 崇倩¹, 王中龙¹, 王爱爱¹, 杨开慧¹, 程明霞¹, 汪溪¹, 杨珞琦¹, 何佳兵¹, 肖敏³, 王子坚³, 薛惠文^{1*}, 苟惠天^{1*}

1 甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州

2 甘肃省靖远县畜牧兽医技术服务中心, 甘肃 靖远

3 甘肃省动物疫病预防控制中心, 甘肃 兰州

王佳雨, 曹青, 张坤中, 崇倩, 王中龙, 王爱爱, 杨开慧, 程明霞, 汪溪, 杨珞琦, 何佳兵, 肖敏, 王子坚, 薛惠文, 苟惠天. 单核细胞增生李斯特菌 *luxS* 基因对该菌环境适应性的影响[J]. 微生物学报, 2026, 66(8): 4150-4166.

WANG Jiayu, CAO Qing, ZHANG Kunzhong, CHONG Qian, WANG Zhonglong, WANG Aiai, YANG Kaihui, CHENG Mingxia, WANG Xi, YANG Luoqi, HE Jiabing, XIAO Min, WANG Zijian, XUE Huiwen, GOU Huitian. Effects of *luxS* on environmental adaptability of *Listeria monocytogenes*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(8): 4150-4166.

摘要:【目的】研究单核细胞增生李斯特菌(*Listeria monocytogenes*, LM) *luxS* 基因缺失对生物被膜形成及应激耐受性的影响, 探讨 *luxS* 基因在单核细胞增生李斯特菌环境适应性调控中的作用。【方法】以 ATCC 19112 为亲本株, 构建 *luxS* 基因缺失株、回补株及空载对照株。通过生长曲线测定、环境适应能力和生物被膜形成能力试验对比分析标准株、缺失株与回补株的表型差异。【结果】与标准株相比, *luxS* 基因缺失株在低温、高渗透压、氧化及酸胁迫等不利条件下环境适应性显著减弱; 生物被膜在培养 24 h 和 48 h 后形成能力显著降低($P<0.01$), 胞外聚合物生成量也显著减少。转录水平分析结果显示, *luxS* 缺失后 *agrA*、*agrB*、*lmo2504* 及 *sigB* 表达水平均显著下调($P<0.05$), 而 *ladR* 基因表达水平显著上调($P<0.05$)。在消毒剂胁迫条件下, MTT 法检测结果表明 *luxS* 基因缺失株在生物被膜培养 48 h 后细胞代谢活性显著低于标准株和回补株($P<0.05$), 而培养 72 h 后各菌株间差异不显著。【结论】本研究表明 *luxS* 基因在调控单核细胞增生李斯特菌环境适应性中发挥重要作用, 可为该病原防控策略的设计提供新的理论依据。

关键词: 单核细胞增生李斯特菌; *luxS* 基因; 环境适应性; 生物被膜

资助项目: 甘肃省现代丝路寒旱农业科技支撑项目(GSLK-2022-17); 甘肃省农业科技支撑项目(KJZC-2024-20)

This work was supported by the Gansu Provincial Modern Silk Road Cold and Arid Agricultural Science and Technology Support Project (GSLK-2022-17) and the Agricultural Science and Technology Support Project of Gansu Province (KJZC-2024-20).

*Corresponding authors. E-mail: XUE Huiwen, xuehw@gsau.edu.cn; GOU Huitian, gouht@gsau.edu.cn

Received: 2026-01-16; Accepted: 2026-03-18; Published online: 2026-03-31

Effects of *luxS* on environmental adaptability of *Listeria monocytogenes*

WANG Jiayu¹, CAO Qing¹, ZHANG Kunzhong², CHONG Qian¹, WANG Zhonglong¹, WANG Aiai¹, YANG Kaihui¹, CHENG Mingxia¹, WANG Xi¹, YANG Luoqi¹, HE Jiabing¹, XIAO Min³, WANG Zijian³, XUE Huiwen^{1*}, GOU Huitian^{1*}

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu, China

2 Jingyuan County Animal Husbandry and Veterinary Technology Service Center, Jingyuan, Gansu, China

3 Gansu Provincial Animal Disease Prevention and Control Center, Lanzhou, Gansu, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects of *luxS* deletion on the biofilm formation and stress tolerance of *Listeria monocytogenes* and to elucidate the role of *luxS* in regulating environmental adaptability of this pathogen. [Methods] With *Listeria monocytogenes* ATCC 19112 as the parental strain, a *luxS*-deleted mutant, a complemented strain, and an empty-vector control strain were constructed. Growth curve analysis, environmental stress tolerance assays and biofilm formation assays were performed to comparatively analyze phenotypic differences among the wild-type, mutant, and complemented strains. [Results] Compared with the wild-type strain, the *luxS*-deleted mutant exhibited reduced adaptability under adverse conditions, including low temperature, high osmotic pressure, oxidative stress, and acid stress. Its biofilm-forming ability decreased after 24 h and 48 h of incubation ($P<0.01$), accompanied by a reduction in the production of extracellular polymeric substances in the biofilm matrix. Further transcriptional analysis revealed that the expression levels of *agrA*, *agrB*, *lmo2504*, and *sigB* were downregulated ($P<0.05$), whereas that of *ladR* was upregulated ($P<0.05$) following *luxS* deletion. Under disinfectant stress, MTT assay showed that the metabolic activity of the *luxS*-deleted strain was lower than that of the wild-type and complemented strains after 48 h of biofilm cultivation ($P<0.05$). After 72 h, no significant differences were observed among the strains. [Conclusion] These findings demonstrate that *luxS* plays a critical role in regulating the environmental adaptability of *L. monocytogenes* and provide a novel theoretical basis for the development of future control and prevention strategies targeting this pathogen.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; *luxS*; environmental adaptability; biofilm

单核细胞增生李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM)简称单增李斯特菌, 是一种重要的食源性致病菌, 能够穿过血脑屏障在孕妇、新生儿等易感人群中引发李斯特菌病 (listeriosis), 常表现为脑膜炎或败血症, 具有高致死率^[1]。LM 广泛存在于自然环境、食品原料及冷链运输环境中, 对环境适应力较强, 可在

加工设备表面形成生物被膜, 使其在食品加工场所中长期存留并造成食品交叉污染, 是食品安全领域重点防控的病原微生物之一^[2]。

细菌环境适应性是指细菌通过调节生理状态和基因表达以应对外界不利条件、维持生存与生长的能力。LM 的生存能力与环境适应性密切相关, 在其生长繁殖过程中需应对低温、高

渗透压、氧化应激及酸性胁迫等不利条件, 这些因素可直接或间接影响细胞膜结构完整性、代谢通路及蛋白质功能, 进而抑制菌体的生长与存活^[3]。LM 可通过调控基因表达及代谢通路对环境胁迫进行生理调节以维持细胞稳态, 使该菌在食品产业链中持续存在且难以彻底清除, 进一步增加了其污染几率与食源性感染的风险。

群体感应(quorum sensing, QS)系统是细菌通过分泌和感知信号分子以调节基因表达的重要机制。在 AI-2 型 QS 系统中, *luxS* 基因可编码合成 AI-2 的关键酶 LuxS, 介导细菌细胞间信号传递, 从而调控生物被膜形成、应激响应及环境适应等相关生理过程^[4]。Ebenberger 等^[5]发现霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)可通过种内通讯调控 QS 系统关键因子 HapR 影响生物被膜的形成, 从而增强其环境适应性和长期存活能力; Li 等^[6]通过缺失猪链球菌(*Streptococcus suis*) 2 型中 *luxS* 基因, 结合应激试验与转录组分析发现, 调控铁代谢、酸及氧化应激的相关基因在细菌环境适应性及生理代谢中发挥关键作用; 此外, 有研究报道副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) *luxS* 基因缺失后可影响其多种生物学特性^[7]。上述研究表明, *luxS* 基因在多种细菌的生理调控过程中具有重要作用。近年来, QS 系统在 LM 中的调控作用逐渐受到关注, 多项研究表明 QS 系统可通过调控 LM 生物被膜形成能力和运动性等表型影响其毒力相关功能表达, 而这些表型与细菌对环境胁迫的适应能力密切相关^[8-9]。然而, 现有研究主要集中于 QS 系统对单一环境因素或单一表型的影响, 关于 *luxS* 基因在多种与食品加工相关环境胁迫条件下调控 LM 环境适应性的具体作用机制尚未见系统性研究。基于此, 本研究以 LM 的 *luxS* 基因为研究对象, 探讨其在低温、高渗透压和酸胁迫等不利环境中的适应能力及生物被膜形成等生物学特性中的作用, 旨在为进一步解析 *luxS* 基因在 LM 环境适应过程中的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及载体

单核细胞增生李斯特菌参考菌株 ATCC 19112、原核表达载体 pET-32a(+)、穿梭载体 pKSV7 及 pSET2 由甘肃农业大学兽医公共卫生学实验室保存; 大肠埃希氏菌 DH5 α 感受态细胞购自北京擎科生物科技股份有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

同源重组连接酶、限制性核酸内切酶 *EcoR* I, TaKaRa 公司; 细菌基因组 DNA/RNA 抽提试剂盒、质粒小量提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒, Omega 公司; Green Taq Mix、反转录试剂盒、qPCR MasterMix、DNA Marker, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 脑心浸出液肉汤培养基、壮观霉素、氯霉素, 北京索莱宝科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 上海碧云天生物技术有限公司; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT], TCI 公司; 总多糖含量测试盒, 上海优选生物科技有限公司。

高速低温离心机, HITACHI 公司; 凝胶成像系统、电穿孔仪, Bio-Rad 公司; 梯度基因扩增仪, Eppendorf 公司; 生物安全超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 引物设计与合成

根据参考菌株 ATCC 19112 基因组序列 (<https://genomes.atcc.org/genomes/dalbf206779541b2>), 使用 Primer Premier 5.0 软件设计基因缺失及回补引物, 并对部分引物的 5'端添加酶切位点(下划线标注), 引物序列信息见表 1。通过在线工具 Primer Quest-design qPCR assays (<https://sg.idtdna.com/pages/tools/primerquest>)设计实时荧光定量 PCR 引物, 引物序列信息见表 2, 所有引物均由北京擎科生物技术有限公司合成。

表1 PCR引物信息

Table 1 Information of PCR primers

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Amplicon size/bp
$\Delta luxS$	<i>luxS</i> -1 CTATGACATGATTACGAATTCATTGGCGGTATAGTCCTT	453
	<i>luxS</i> -2 GCTTTCATTAGCGTATCCCTCCTCTTAT	
	<i>luxS</i> -3 AGGGATACGCTAATGAAAGCATCTACCTCT	
	<i>luxS</i> -4 CCGGGTACCGAGCTCGAATTCCTCCGCTTGATTGAGATA	518
	pKSV7-F CGGCTCGTATGTTGTGT	
	pKSV7-R GAAGCATTATCAGGGTTAT	
$C\Delta luxS$	<i>ChuxS</i> -F AAAACGACGGCCAGTGAATTCATGGCAGAAAAATGAATGT	468
	<i>ChuxS</i> -R CCGAGTACCGAGCTCGAATTCCTTATTCACCAAACACATTTTT	
	pSET2-F GCGAAAGGGGGATGTG	214
	pSET2-R GGCTCGTATGTTGTGTGG	

表2 RT-qPCR引物信息

Table 2 Information on RT-qPCR primers

Primer names	Primer sequences (5'→3')
<i>gryB</i>	<i>gryB</i> -F GAGTTGGTGCATCGGTAGTT
	<i>gryB</i> -R TCGCCTTGTTCTTCCATATCC
<i>luxS</i>	<i>luxS</i> -F GGCCTCCATGGAGATGAAATA
	<i>luxS</i> -R CAAGTTCTGCCATCAAATGTTCT
<i>agrA</i>	<i>agrA</i> -F GATCCGCGTGTTTCATTATTT
	<i>agrA</i> -R TCAAGCGCTTCCACCTTATAC
<i>agrB</i>	<i>agrB</i> -F CGAAAGACCGCTGGAAAGA
	<i>agrB</i> -R CCGTATACGAGAGCAAACCTTCA
<i>lmo2504</i>	<i>lmo2504</i> -F ACAGCGACAGGGATTGATTTA
	<i>lmo2504</i> -R CTGCAATTGCTTGTCCTATC
<i>sigB</i>	<i>sigB</i> -F CGCGCCGAATCAAAGAATTAG
	<i>sigB</i> -R TCCGTGACACCGATGAAATC
<i>ladR</i>	<i>ladR</i> -F CTGGCTTAGACTCTTTGCTTGA
	<i>ladR</i> -R GTCCCTTGTTCTGGCATTAT

1.4 *luxS* 基因缺失株的构建及鉴定

参照细菌全基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取 LM ATCC 19112 基因组 DNA。以提取的基因组 DNA 为模板, 使用高保真 DNA 聚合酶分别以引物对(*luxS*-1/*luxS*-2)和(*luxS*-3/*luxS*-4)进行 PCR 扩增, 获得 *luxS* 基因的上下游同源臂。PCR 反应体系(15 μ L): Green Taq Mix 7.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 4.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预

变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。产物经凝胶电泳检测条带大小正确后, 使用试剂盒进行切胶回收纯化。随后, 以纯化后的上游和下游同源臂片段为模板进行 SOE-PCR 扩增, 反应体系及条件同上, 扩增产物经纯化。将温敏型穿梭质粒 pKSV7 于 37 $^{\circ}$ C 条件下 *Eco*R I 酶切 2 h, 反应产物同样进行纯化。将上述 2 种纯化产物通过同源重组连接酶连接, 连接产物经热激法转化至 DH5 α 感受态细胞中, 涂布于含氯霉素的抗性平板筛选阳性克隆。挑取单菌落, 以 pKSV7-F 和 pKSV7-R 引物进行 PCR 鉴定, 将扩增条带大小为 1 171 bp 的重组质粒送北京擎科生物科技股份有限公司测序验证。比对无误后, 将构建成功的重组质粒命名为 pKSV7- $\Delta luxS$ 。

将 pKSV7- $\Delta luxS$ 电转化至已制备好的 LM 感受态细胞中, 于 42 $^{\circ}$ C 含氯霉素的双重选择压力下连续传代进行同源重组。之后将菌株转接至 30 $^{\circ}$ C 无抗生素培养基中连续传代约 10 代, 使质粒丢失。经菌液 PCR 鉴定条带大小正确且确认稳定遗传后, 命名为缺失株 $\Delta luxS$ 。

1.5 *luxS* 基因回补株的构建及鉴定

以 ATCC 19112 基因组 DNA 为模板, 使用 *ChuxS*-F 和 *ChuxS*-R 引物进行 PCR 扩增, 反应体

系及条件同 1.4 节。将 PCR 产物与经酶切的穿梭载体 pSET2 连接, 并转化至 DH5 α 感受态细胞中。经 PCR 鉴定并测序验证质粒构建正确后, 将测序正确的重组质粒电转至制备好的缺失株 $\Delta luxS$ 感受态细胞中。挑取单菌落, 以 pSET2-F 和 pSET2-R 进行菌液 PCR 验证。将条带大小正确的菌株命名为回补株 C $\Delta luxS$ 。

1.6 回补株的验证

1.6.1 *luxS* 基因转录水平的 RT-qPCR 验证

使用试剂盒提取 ATCC 19112、 $\Delta luxS$ 和 C $\Delta luxS$ 的总 RNA, 测定浓度后参照试剂盒说明书反转录为 cDNA。以 *gyrB* 为内参基因, 采用 RT-qPCR 检测各菌株中目的基因 *luxS* 的转录水平变化。RT-qPCR 反应体系(20 μ L): 2 $\times$ SYBR Green Pro Taq HS Premix 10 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。RT-qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 100 s; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}$ C 90 s; 60 $^{\circ}$ C 60 s; 以 0.5 $^{\circ}$ C/s 速率逐步升温至 95 $^{\circ}$ C, 持续采集荧光信号以绘制溶解曲线; 37 $^{\circ}$ C 反应 10 s, 使反应体系降至室温。每个菌株的内参基因和目的基因均设 3 个生物学重复。

1.6.2 *LuxS* 蛋白表达水平的 Western blotting 验证

参照 1.5 节方法重新构建带有 His 标签的回补株及阳性对照 *luxS*-pET-32a(+)重组蛋白表达载体, 以缺失株作为阴性对照, 进行 Western blotting 验证。将上述 3 株菌分别收集菌体并处理样品, 经 SDS-PAGE 后转至 PVDF 膜, 室温封闭 1 h 后依次以抗 His 标签一抗及 HRP 标记二抗孵育, 采用 ECL 化学发光法显色, 曝光成像后观察目的条带。

1.7 空载对照株的构建

将空载穿梭质粒 pSET2 分别电转至 ATCC 19112 和 $\Delta luxS$ 感受态细胞中, 30 $^{\circ}$ C 培养 24–48 h, 在含壮观霉素的 BHI 平板上筛选获得

含 pSET2 空载质粒的菌株。电转成功的阳性克隆分别命名为标准株空载对照 LM19112-pSET2 和缺失株空载对照 $\Delta luxS$ -pSET2, 后续分别简称为 LM19112-pSET2 和 $\Delta luxS$ -pSET2。

1.8 不同温度下生长曲线的测定

将 LM19112-pSET2、 $\Delta luxS$ -pSET2 和回补株 C $\Delta luxS$ 在含壮观霉素的 BHI 平板上划线复苏, 挑取单菌落接种至培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 恒温振荡培养过夜。使用紫外分光光度计将各菌株菌悬液的 OD₆₀₀ 值调整为 0.5, 按 1:100 比例将菌液接种至 30 mL 含壮观霉素的 BHI 液体培养基中, 继续于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下振荡培养; 另取菌液于 4 $^{\circ}$ C 条件下静置培养。37 $^{\circ}$ C 条件下接种 3 h 后开始测定 OD₆₀₀ 值, 此后每隔 1 h 测定 1 次, 直至细菌生长曲线进入平台期; 4 $^{\circ}$ C 条件下自开始培养后每隔约 12 h 测定 1 次 OD₆₀₀ 值, 直至曲线进入平台期^[10]。每组设 3 个平行样本, 独立重复 3 次。

1.9 三种环境应激条件下的耐受性测定

1.9.1 抗氧化应激和酸应激试验

挑取 LM19112-pSET2、 $\Delta luxS$ -pSET2 和回补株 C $\Delta luxS$ 单菌落接种至含壮观霉素的 BHI 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 6 h 至 OD₆₀₀ 值为 0.6–0.8, 8 000 r/min 离心 2 min 收集菌体沉淀, 以无菌 1 $\times$ PBS 缓冲液重悬菌体并洗涤 3 次, 再稀释调节 OD₆₀₀ 值至 0.5。取 100 μ L 调节好的菌液分别加入 900 μ L 含 10 mmol/L H₂O₂ 的培养基 BHI (pH 3.0) 中, 混匀后于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。倍比稀释后进行平板涂布, 同时设置未应激处理对照组, 统计菌落数。试验重复 3 次。应激存活率计算如公式(1)所示。

$$\text{应激存活率} = \frac{\text{应激处理菌落数}}{\text{未应激处理菌落数}} \times 100\% \quad (1)$$

1.9.2 抗高渗应激试验

参考郭赛等^[11]方法进行抗高渗应激试验, 将 LM19112-pSET2、 $\Delta luxS$ -pSET2 和回补株 C $\Delta luxS$ 于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养过夜,

次日将各菌株菌悬液 OD_{600} 值调整至 0.5, 按 1:100 比例接种至含 5% NaCl 的 BHI 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 条件下振荡培养, 每隔 1 h 测定 1 次 OD_{600} 值, 直至菌液生长达到平台期。每组设 3 个平行样本, 独立重复 3 次。

1.10 菌株运动能力检测

采用半固体琼脂平板法测定菌株运动性。将 37 °C、200 r/min 培养过夜的 LM19112-pSET2、 $\Delta luxS$ -pSET2 和回补株 $C\Delta luxS$ 菌液 OD_{600} 值调节至 0.5, 取 2 μ L 菌液点接于含 0.3% 琼脂的 BHI 半固体培养基中央, 于 30 °C 静置培养 24 h。培养结束后, 通过测定菌落向外扩散形成的泳动直径评价菌株运动能力, 每组设 3 个平行样本, 独立重复 3 次。

1.11 菌株生物被膜形成能力测定

将 LM19112-pSET2、 $\Delta luxS$ -pSET2 和回补株 $C\Delta luxS$ 分别于 37 °C、200 r/min 培养过夜, 次日按 1:100 转接至新鲜培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 5 h 至 OD_{600} 值为 0.5。以含壮观霉素的 BHI 培养基按 1:100 比例稀释备用。在 96 孔细胞培养板中每孔加入 200 μ L 稀释菌液, 置于 37 °C 恒温培养箱中静置培养 24、48、72 h。

生物被膜定量采用结晶紫染色法^[12]。培养结束后, 小心弃去孔内培养上清液, 以无菌 1×PBS 缓冲液轻柔洗涤 3 次, 彻底去除未黏附的浮游细菌。每孔加入 200 μ L 甲醛固定 15 min, 通风处干燥 10 min。加入 0.5% 结晶紫染色液染色 10 min, 吸弃染液, 以蒸馏水反复冲洗数次并充分晾干。每孔加入 200 μ L 90% 乙醇溶液溶解结晶紫, 以微孔板分光光度计于 OD_{595} 处测定吸光度值。每组设 3 个平行样本, 并独立重复 3 次。

1.12 *luxS* 基因对生物被膜胞外聚合物的影响

1.12.1 生物被膜胞外多糖含量的测定

参考朱黄琛等^[13]方法, 将 LM19112-pSET2、

$\Delta luxS$ -pSET2 和回补株 $C\Delta luxS$ 划线活化单菌落, 37 °C、200 r/min 培养 5 h 至 OD_{600} 值为 0.5, 按 1:100 稀释备用。提前在 12 孔细胞培养板中放置无菌细胞爬片, 每孔加入 1 mL 稀释菌液, 并设阴性对照。37 °C 培养 48 h 和 72 h 后, 吸弃上清液, 以无菌 1×PBS 缓冲液冲洗 3 次, 取出细胞爬片置于含 3 mL 1×PBS 缓冲液的离心管中, 冰浴条件下 40 W 超声 3 min, 4 °C、8 000 r/min 离心 30 min。将上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤, 收集胞外聚合物样品备用。

采用总多糖含量测定试剂盒测定胞外多糖含量, 预先绘制标准曲线。吸取 200 μ L 样品、100 μ L 试剂一和 500 μ L 浓硫酸混匀, 90 °C 水浴 20 min, 冷却后取 200 μ L 加入 96 孔板, 于 OD_{490} 处测定吸光度值, 根据标准曲线计算样品浓度(μ g/mL)。每组设 3 个平行样本, 独立重复 3 次。

1.12.2 生物被膜胞外蛋白含量的测定

采用 BCA 法测定胞外蛋白含量, 预先绘制标准曲线。吸取 20 μ L 样品与 200 μ L BCA 工作液混匀, 加入 96 孔板, 37 °C 静置 30 min, 于 OD_{562} 处测定吸光度值, 根据标准曲线计算样品浓度(μ g/mL)。每组设 3 个平行样本, 重复 3 次。

1.13 RT-qPCR 测定 *luxS* 基因缺失对生物被膜相关基因表达的影响

通过在线工具 Primer Quest-design qPCR assays 设计实时荧光定量 PCR 引物。提取 LM19112-pSET2、 $\Delta luxS$ -pSET2 和回补株 $C\Delta luxS$ 的总 RNA, 测定浓度后参照试剂盒说明书反转录为 cDNA。以 *gyrB* 为内参基因, 生物被膜相关基因(*agrA*、*agrB*、*lmo2504*)、应激反应基因(*sigB*)及 PadR 家族转录调控蛋白基因(*ladR*)为目的基因, 采用 RT-qPCR 检测各基因转录水平变化。RT-qPCR 反应体系及条件同 1.6.1 节, 每个菌株的内参基因和目的基因均设 3 个生物学重复, 独立重复 3 次。

1.14 各菌株对 3 种消毒剂的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)测定

将 LM19112-pSET2、 $\Delta luxS$ -pSET2 和回补株 C $\Delta luxS$ 分别于 37 °C 培养过夜, 次日按 1:100 转接至新鲜培养基中培养, 待 OD_{600} 值调整至 1.0 后, 以含壮观霉素的 BHI 培养基按 1:1 000 比例稀释备用。将 0.2% HCHO 溶液、0.5% I_2 溶液和 2% NaOH 溶液以 ddH₂O 进行连续 2 次倍比稀释, 各管浓度如表 3 所示。将不同浓度的消毒剂在 96 孔板中各加 10 μ L, 每孔加入 100 μ L 制备好的菌液, 混匀后于 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后观察结果。

1.15 MTT 还原法检测消毒剂作用下生物被膜细胞代谢活性

参考陈月桃^[14]方法, 采用 MTT 还原法测定消毒剂处理后生物被膜的代谢活性。将 LM19112-pSET2、 $\Delta luxS$ -pSET2 和回补株 C $\Delta luxS$ 在 96 孔板中分别培养 48 h 和 72 h 以形成生物被膜, 弃去培养液并以 PBS 洗涤 3 次。随后分别加入含 MIC 和 5×MIC 浓度 HCHO、 I_2 和 NaOH 的 BHI 液体培养基, 于 37 °C 静置培养 24 h。处理结束后洗涤去除残留消毒剂, 每孔加入 MTT 溶液 (0.5 mg/mL) 避光孵育 3 h, 弃去上清后每孔加入 DMSO 溶解生成的甲瓩结晶, 于 OD_{570} 处测定吸光值。生物被膜细胞代谢活性计算如公式(2)所示。

$$\text{细胞代谢活性} = \frac{\text{消毒剂处理组 } OD_{570}}{\text{未处理组的 } OD_{570}} \times 100\% \quad (2)$$

表3 消毒剂连续倍比稀释后的浓度梯度

Table 3 Concentrations of disinfectant after two-fold serial dilution

Disinfectant	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.2% HCHO	2 000	1 000	500	250	125.00	62.50	31.25	15.63	7.81	3.91	+	-
0.5% I_2	5 000	2 500	1 250	625	312.50	156.25	78.13	39.06	19.53	9.77	+	-
2.0% NaOH	20 000	10 000	5 000	2 500	1 250.00	625.00	312.50	156.25	78.13	39.06	+	-

The concentration unit is μ g/mL; Well 11 serves as the positive control; Well 12 serves as the negative control.

1.16 统计分析

所有试验数据均采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理与作图。采用 t 检验分析数据。统计学显著性水平设定如下: $P < 0.05$ 表示差异显著, 标记为*; $P < 0.01$ 表示差异高度显著, 标记为**; $P < 0.001$ 表示差异极显著, 标记为***; ns 表示无显著差异($P > 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 $luxS$ 缺失株和回补株的构建和鉴定

以标准株 ATCC 19112、缺失株 $\Delta luxS$ 和回补株 C $\Delta luxS$ 菌液为模板, 通过引物 $luxS$ -1 和 $luxS$ -4 对其进行 PCR 扩增, 标准株 ATCC 19112 PCR 产物条带大小为 1 439 bp, 缺失株 $\Delta luxS$ 条带大小为 971 bp, 较标准株减少 468 bp (图 1A, 泳道 1 和泳道 2), 回补株条带大小与缺失株一致(图 1A, 泳道 2 和泳道 3); 使用引物 $CluxS$ -F 和 $CluxS$ -R 对其扩增时, 得到标准株与回补株条带大小均为 468 bp (图 1B, 泳道 1 和泳道 3), 缺失株无条带(图 1B, 泳道 2)。

同时, 采用 RT-qPCR 检测 $luxS$ 基因转录水平, 结果显示缺失株表达量接近 0, 回补株表达水平明显高于标准株, 约为标准株的 12 倍(图 1C)。上述结果表明缺失株 $\Delta luxS$ 和回补株 C $\Delta luxS$ 构建成功。Western blotting 结果显示, 目的蛋白理论分子量约为 18 kDa, 阴性对照组在 18 kDa 处未检测到明显目的蛋白条带, 而阳性对照和带有 His 标签的回补株在 18 kDa 处均检测到明显的特异性条带(图 1D), 表明 $luxS$ 基因已在回补株中成功表达, 回补株构建成功。

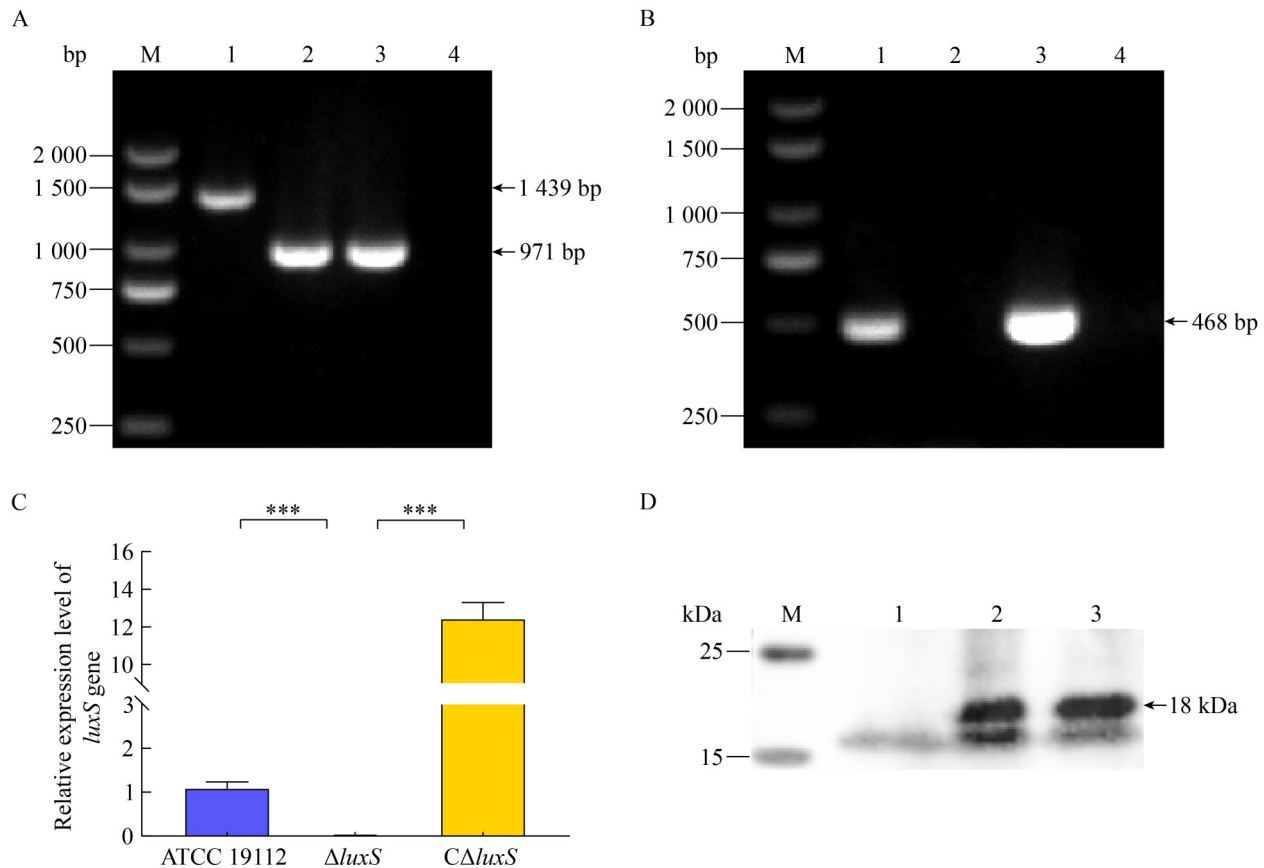


图1 *luxS*基因缺失株和回补株的鉴定结果

Figure 1 Identification results of *luxS* gene deletion and complementation strains. A: PCR amplification of the three strains using primers *luxS*-1 and *luxS*-4; B: PCR amplification of the three strains using primers *CluxS*-F and *CluxS*-R; C: Identification of gene edited strains using RT-qPCR; D: Identification of complemented strains using Western blotting method. In A and B, Lane: M: DL2000 DNA marker; Lane 1: ATCC 19112; Lane 2: $\Delta luxS$; Lane 3: $C\Delta luxS$; Lane 4: negative control. In D, Lane: M: Protein molecular weight marker; Lane 1: Negative control; Lane 2: Positive control; 3: His-tagged complemented strain. ***: $P < 0.001$.

2.2 空载对照株的构建与鉴定

将空载质粒 pSET2 分别电转入 ATCC 19112 和 $\Delta luxS$ 感受态细胞中, 以 pSET2-F 和 pSET2-R 引物进行 PCR 鉴定, 均获得约 214 bp 的条带, 分别为 LM19112-pSET2 (图 2, 泳道 1 和泳道 2) 和 $\Delta luxS$ -pSET2 (图 2, 泳道 3 和泳道 4)。LM19112-pSET2 和 $\Delta luxS$ -pSET2 作为 $C\Delta luxS$ 的空载对照株, 用于排除 pSET2 质粒本身对 $C\Delta luxS$ 表型的干扰。

2.3 不同温度条件下各菌株生长特性差异

在 37 °C 条件下 LM19112-pSET2、 $\Delta luxS$ -pSET2 和回补株 $C\Delta luxS$ 均在 7–13 h 处于对数生长期, 13 h 后进入平台期, 生长趋势无明显差异 ($P > 0.05$, 图 3A)。在 4 °C 条件下, 3 株菌均在 6–9 d 处于对数生长期, 9 d 后进入平台期; 此外, $\Delta luxS$ -pSET2 的生长速率较 LM19112-pSET2 显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$, 图 3B)。

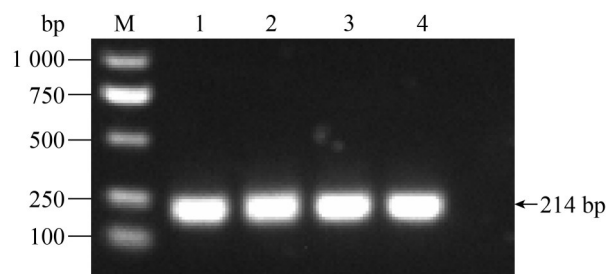


图2 空载对照株的PCR鉴定结果

Figure 2 PCR identification of empty vector control strain. Lane M: DL2000 DNA marker; Lanes 1, 2: Wild-type empty vector control strain LM19112-pSET2; Lanes 3, 4: Mutant empty vector control strain $\Delta luxS$ -pSET2; Lane 5: Negative control.

结果表明, 在 4 °C 低温培养条件下 $luxS$ 基因缺失可显著影响细菌的生长能力。

2.4 不同应激条件下菌株耐受性分析

2.4.1 氧化与酸应激条件下菌株耐受性差异分析

经氧化应激和酸应激处理后, 将菌液稀释至 10^{-4} 梯度进行平板计数, 根据菌落计数结果计算存活率。结果显示, $\Delta luxS$ -pSET2 的存活率为 $(3.56 \pm 0.88)\%$, 显著低于 LM19112-pSET2 的 $(9.97 \pm 1.54)\%$ 和回补株 $C\Delta luxS$ 的 $(9.47 \pm 1.65)\%$ ($P < 0.01$, 图 4A), 表明缺失 $luxS$ 基因可使 LM 对氧化环境的耐受能力下降。同样地, 在 pH

3.0 胁迫条件下, $\Delta luxS$ -pSET2 的存活率为 $(14.79 \pm 1.07)\%$, 极显著低于 LM19112-pSET2 的 $(44.77 \pm 1.87)\%$ 和回补株 $C\Delta luxS$ 的 $(44.03 \pm 3.60)\%$ ($P < 0.001$, 图 4B), 表明 $luxS$ 基因缺失显著降低了菌株对酸胁迫的耐受能力。

2.4.2 高渗胁迫条件下菌株耐受性差异分析

如图 5 所示, 在 5% NaCl 条件下, 应激早期 $\Delta luxS$ -pSET2 和 LM19112-pSET2 对高渗透压胁迫的耐受性差异不显著 ($P > 0.05$); 而在对数生长期后期及平台期, $\Delta luxS$ -pSET2 的耐受能力显著低于 LM19112-pSET2 ($P < 0.05$), 推测 $luxS$ 基因可能在细菌密度较高时对高渗透压环境产生影响。

2.5 菌株运动能力表型差异分析

通过测定 LM19112-pSET2、 $\Delta luxS$ -pSET2 和回补株 $C\Delta luxS$ 在 BHI 半固体培养基上的运动圈直径评价其运动能力。如图 6 所示, 各菌株的运动圈直径均约为 3 mm, 菌株间差异不显著 ($P > 0.05$), 说明 $luxS$ 基因缺失对 LM 运动能力的影响不明显。

2.6 $luxS$ 基因对菌株生物被膜形成能力的影响

结晶紫染色法检测结果如图 7 所示, 各菌株生物被膜量随培养时间延长而增加。培养 24 h 和 48 h 后, $\Delta luxS$ -pSET2 的生物被膜量均

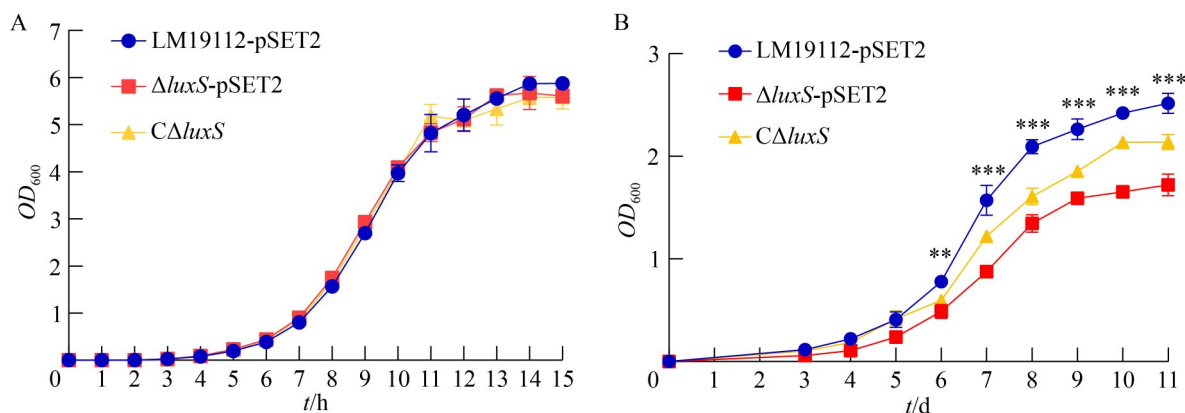


图3 三株菌在37 °C (A)和4 °C (B)下的生长曲线

Figure 3 Growth curves of the three strains at 37 °C (A) and 4 °C (B). **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

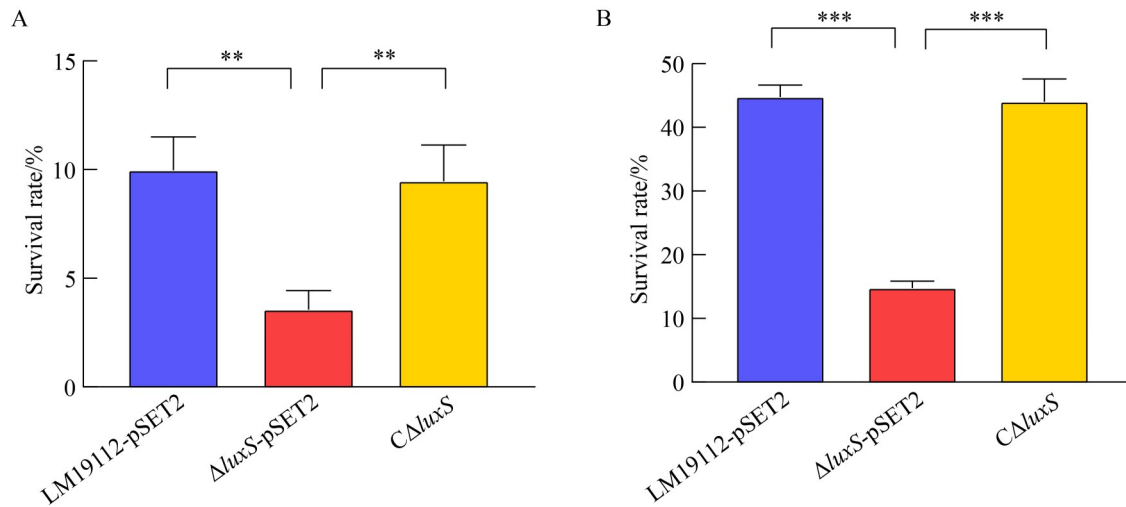


图4 氧化应激和酸应激条件下三株菌的存活率测定

Figure 4 Determination of survival rates of three strains under oxidative and acid stress conditions. A: Survival rates after treatment with 10 mmol/L H_2O_2 ; B: Survival rates after treatment at pH 3.0. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

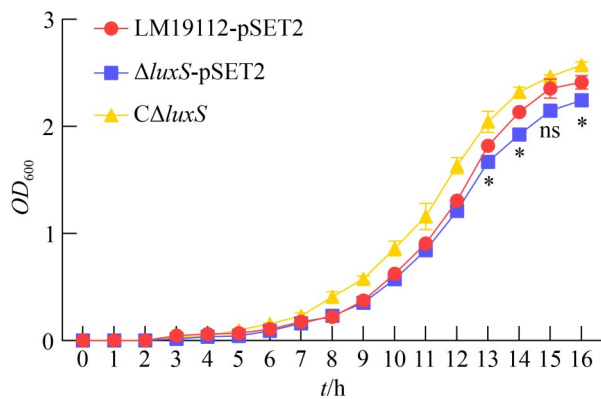


图5 高渗条件下三株菌应激能力测定

Figure 5 Determination of stress tolerance of three strains under hyperosmotic stress. ns: $P > 0.05$; *: $P < 0.05$.

显著低于 LM19112-pSET2 和回补株 ($P < 0.01$); 而培养 72 h 后, 3 株菌之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.7 luxS 基因对生物被膜胞外聚合物组成的调控

2.7.1 luxS 基因对胞外多糖的影响

采用苯酚-硫酸法检测生物被膜胞外多糖含量, 通过葡萄糖标准曲线计算胞外多糖含量。如图 8 所示, 缺失 $luxS$ 基因后, 培养 48 h 胞外

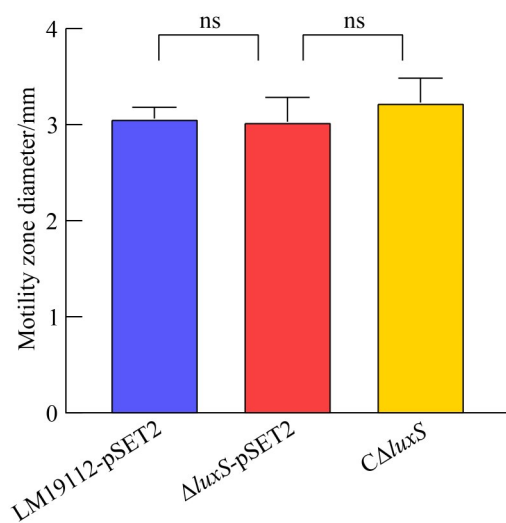


图6 三株菌运动圈直径比较

Figure 6 Comparison of motility zone diameters among three strains. ns: $P > 0.05$.

多糖量较标准株显著减少 ($P < 0.01$, 图 8B); 而培养 72 h 后, 3 株菌之间的胞外多糖含量无明显差异 ($P > 0.05$, 图 8B)。

2.7.2 luxS 基因对胞外蛋白的影响

采用 BCA 法检测缺失 $luxS$ 基因后对生物被膜胞外蛋白的影响, 通过蛋白质标准曲线计算

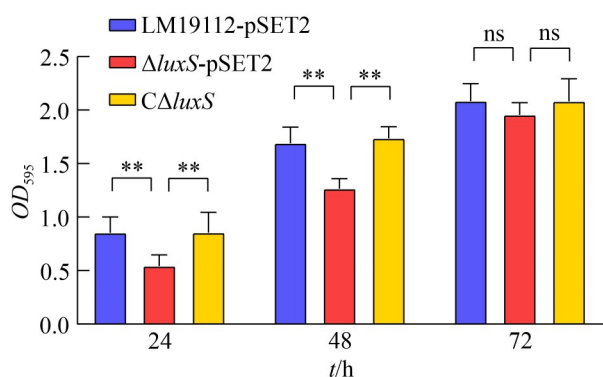


图7 三株菌生物被膜形成能力测定

Figure 7 Determination of biofilm formation ability of the three strains. ns: $P>0.05$; **: $P<0.01$.

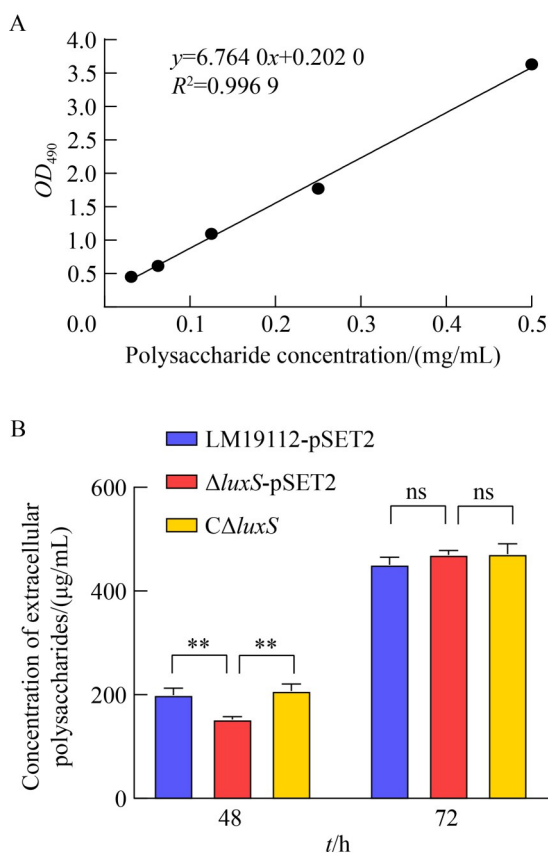


图8 苯酚-硫酸法检测胞外多糖含量

Figure 8 Determination of extracellular polysaccharide content by phenol-sulfuric acid method. A: Glucose standard curve; B: Determination of extracellular polysaccharide content of three strains. ns: $P>0.05$; **: $P<0.01$.

胞外蛋白含量。如图9所示,培养48 h后缺失株的胞外蛋白量较标准株显著减少($P<0.01$,图9B);培养72 h后3株菌之间的胞外蛋白含量无明显差异($P>0.05$,图9B)。如图7-9所示,培养前48 h, *luxS* 缺失株相较标准株与回补株胞外多糖及胞外蛋白含量均明显降低;而培养72 h后差异不显著。其变化趋势与生物被膜量一致,表明 *luxS* 基因可能通过影响胞外聚合物的合成而调控生物被膜的形成。

2.8 *luxS* 基因缺失对 LM 生物被膜相关基因表达的调控

RT-qPCR 结果如图10所示,与 LM19112-pSET2 相比, Δ*luxS*-pSET2 中群体感应系统调控

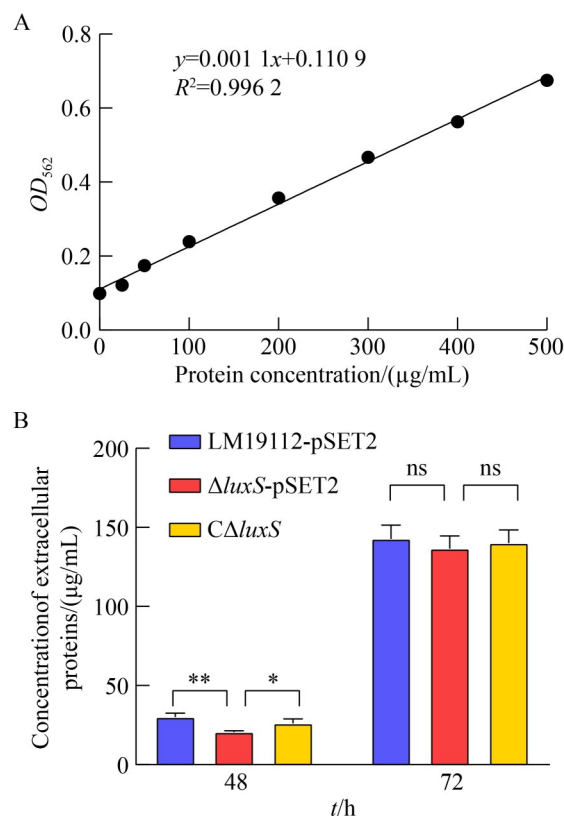


图9 BCA法检测胞外蛋白含量

Figure 9 Determination of extracellular protein content by BCA assay. A: Protein standard curve; B: Determination of extracellular protein content in the three strains. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

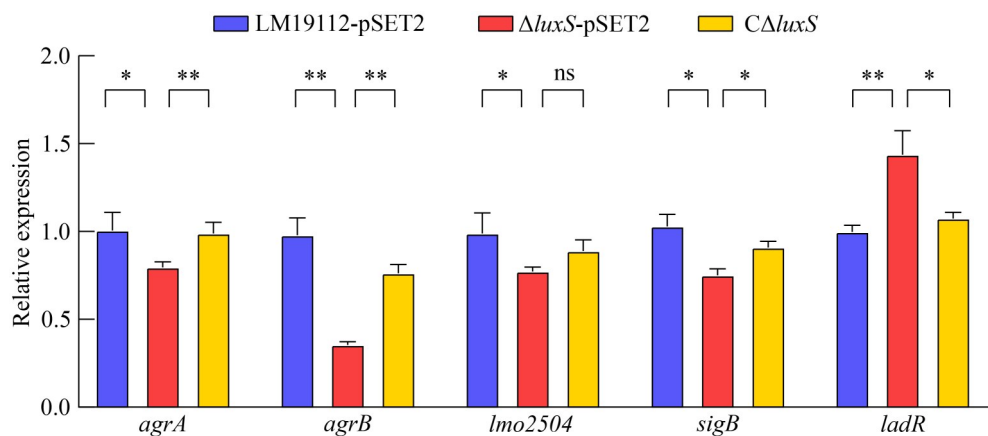


图10 *luxS*基因缺失对生物被膜相关基因表达量的影响
Figure 10 Effects of *luxS* gene deletion on the expression of biofilm-related genes. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

基因 *agrA* 和 *agrB* 的表达量均显著下调($P<0.05$), 生物被膜相关基因 *lmo2504* 的表达水平也明显降低($P<0.05$)。结合生物被膜测定结果, $\Delta luxS$ -pSET2 生物被膜形成能力显著减弱, 二者变化趋势一致。此外, 应激调控基因 *sigB* 在 $\Delta luxS$ -pSET2 中的表达水平同样低于标准株和回补株 ($P<0.05$), 这与应激耐受性试验中 $\Delta luxS$ -pSET2 在氧化应激、酸胁迫及高渗胁迫条件下存活率均明显降低有关。*ladR* 基因在 $\Delta luxS$ -pSET2 中表达水平显著上调($P<0.05$), *LadR* 为 *PadR* 家族转录调控蛋白, 参与细菌碳代谢及环境适应性相关基因的调控, 该结果与已有报道中 *luxS* 缺失后 *ladR* 表达水平上调的现象一致^[15]。上述结果表明, *luxS* 基因缺失可通过调控 *agrA*、*agrB*、*lmo2504*、*sigB* 和 *ladR* 的表达影响生物被膜的形成及环境应激反应。

2.9 各菌株对 3 种消毒剂的 MIC 测定

选用 0.2% HCHO、0.5% I_2 和 2% NaOH 3 种消毒剂测定 3 株菌的 MIC 值。如表 4 所示, 3 株菌对同种消毒剂的 MIC 值相近, 表明缺失 *luxS* 基因对消毒剂的 MIC 值无显著影响。

表4 三种消毒剂对各菌株的MIC
Table 4 Minimum inhibitory concentration of three disinfectants against different strains

Disinfectant	Strain	MIC value/(μ g/mL)
0.2% HCHO	LM19112-pSET2	62.5
	$\Delta luxS$ -pSET2	62.5
	C $\Delta luxS$	62.5
0.5% I_2	LM19112-pSET2	312.5
	$\Delta luxS$ -pSET2	312.5
	C $\Delta luxS$	312.5
2.0% NaOH	LM19112-pSET2	625.0
	$\Delta luxS$ -pSET2	625.0
	C $\Delta luxS$	625.0

2.10 消毒剂胁迫下各菌株生物被膜细胞代谢活性的差异

采用 MTT 法测定不同消毒剂处理条件下生物被膜细胞的代谢活性。如图 11 所示, 生物被膜培养 48 h 后, 经 3 种消毒剂 MIC 浓度处理后缺失株 $\Delta luxS$ -pSET2 的细胞代谢活性在 MIC 和 5×MIC 条件下均低于标准株 LM19112-pSET2 (图 11A、11C、11E); 且在 5×MIC 条件下, 3 株菌生物被膜细胞代谢活性均进一步下降, $\Delta luxS$ -pSET2 较标准株与回补株差异显著($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。培养至 72 h 后, 3 株菌在不同消毒剂

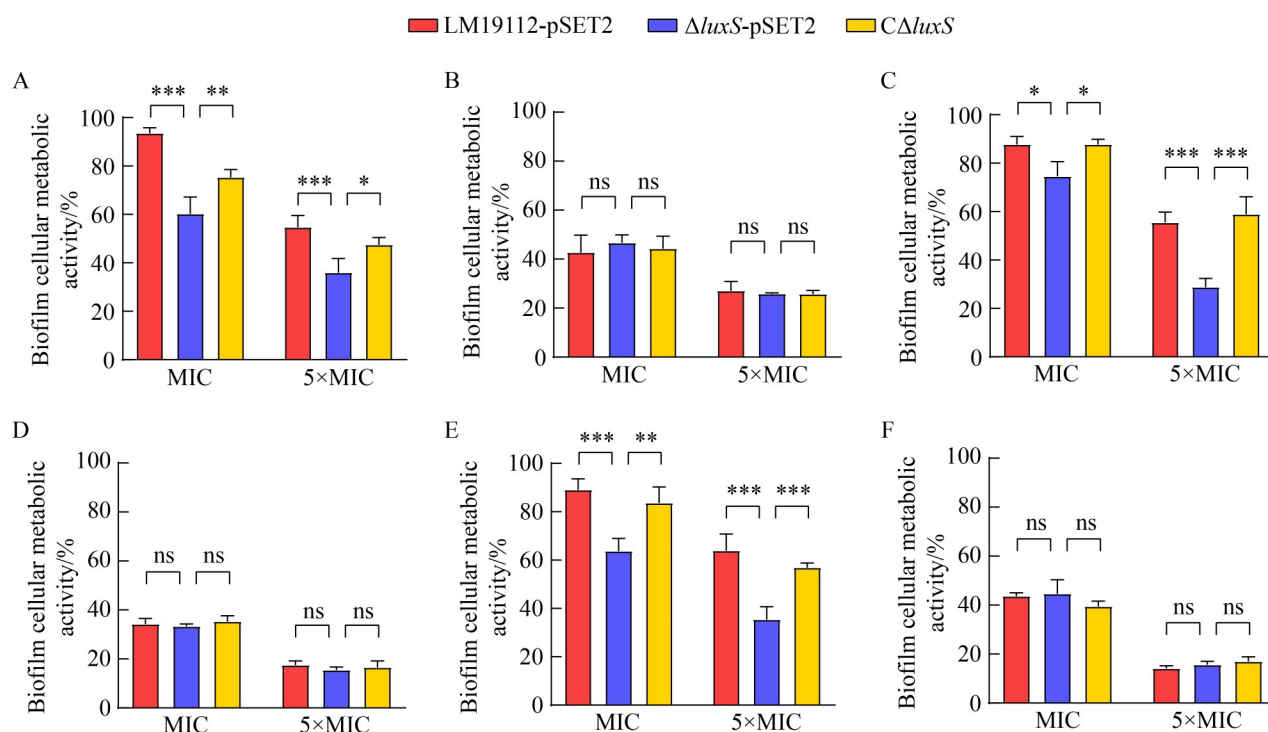


图11 三种消毒剂对各菌株生物被膜细胞代谢活性的影响

Figure 11 Effects of three disinfectants on the metabolic activity of biofilm cells in different strains. A, B: Effects of HCHO on 48 h and 72 h biofilms; C, D: Effects of I_2 on 48 h and 72 h biofilms; E, F: Effects of NaOH on 48 h and 72 h biofilms. MIC indicates the minimum inhibitory concentration, and 5xMIC indicates five times the minimum inhibitory concentration. In A–B, the MIC and 5xMIC concentrations of HCHO were 62.5 $\mu\text{g/mL}$ and 312.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In C–D, the MIC and 5xMIC concentrations of I_2 were 312.5 $\mu\text{g/mL}$ and 1 562.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. In E–F, the MIC and 5xMIC concentrations of NaOH were 625 $\mu\text{g/mL}$ and 3 125 $\mu\text{g/mL}$, respectively. ns: $P>0.05$; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

及浓度处理下的生物被膜细胞代谢活性整体降低(图 11B、11D、11F), 但菌株间差异均不显著 ($P>0.05$)。综上所述, 在生物被膜培养 48 h 后, $luxS$ 缺失株在不同消毒剂处理条件下的细胞代谢活性均低于标准株及回补株, 而培养 72 h 后菌株间差异不显著。结合生物被膜形成量试验结果, 推测 $luxS$ 基因缺失导致细菌生物被膜形成能力减弱, 进而影响生物被膜细胞对外界消毒剂胁迫的整体耐受能力。

3 讨论与结论

LM 具有较强的环境耐受能力, 能够在食品

加工环境中的低温、高渗透压及氧化应激等多种不利条件下长期存活, 对食品安全和公共卫生构成潜在威胁^[16]。目前普遍认为, 该菌对环境的适应能力主要依赖于各调控通路的精密协调, 使其能够灵敏感知并响应外界信号^[17]。QS 系统是细菌在复杂环境中协调群体行为的重要调控机制, 在环境适应性中发挥关键作用, 主要通过感应细菌生长发育过程中分泌的信号分子浓度来判断群体密度, 进而调控生物被膜形成、胞外基质合成、代谢调节及胁迫应答等生理过程^[18]。然而, LM 中相关研究较为匮乏。本研究通过缺失 LM ATCC 19112 标准株中的 $luxS$

基因, 从不同温度下的生长发育、生物被膜形成能力及环境应激耐受性等方面对 *luxS* 基因缺失株的生物学表型进行了系统分析。结果表明, 缺失该基因后在适宜条件下不影响 LM 的生长发育, 但在低温环境、生物被膜形成早期、胞外基质合成, 以及氧化、高渗透压、酸胁迫耐受和抗消毒剂胁迫过程中 LM 的生长发育均受到不同程度的影响, 证明 *luxS* 基因在其中发挥着重要的调控作用。

LuxS/AI-2 介导的 QS 系统广泛存在于革兰阳性和阴性细菌中, 信号分子 AI-2 可在不同物种间传递信号, 影响 LM 群体行为的调控^[19]。其中 LuxS 作为合成 AI-2 的关键酶, 当缺失 *luxS* 基因时可对细菌运动能力、抗菌药物敏感性 & 应激适应能力等方面产生影响^[20], 表明 *luxS* 并非单一的调控因子, 而是在调控信号分子生成的同时也参与相关代谢网络的调节^[21]。细菌的环境适应性通常体现在不同外界条件下维持自身生长和存活的能力, 已有研究报道, LM 低温生长依赖多种系统的协同作用, 包括钴胺素、鞭毛基因及 rRNA 分子等^[22-24]。本研究中, 37 °C 条件下 3 株菌的生长曲线基本重合, 但在 4 °C 低温条件下缺失株生长能力明显低于标准株, 表明 LM 在适宜温度下生长时并不依赖 *luxS* 基因, 而在低温环境下该基因的缺失可显著抑制菌株生长, *luxS* 基因可能参与了低温环境适应的调控过程。有研究发现, LM 中 LuxS/AI-2 介导的 QS 系统可通过多种调控通路影响细菌运动性及多种生理功能的调节, 有助于该菌在多重胁迫环境中维持生理活性和结构稳定性^[25]。本研究通过不同条件下的应激存活试验发现, *luxS* 基因缺失显著降低了 pH 3.0 和 10 mmol/L H₂O₂ 条件下的存活率, 这与张晓荟等^[26]对 *lmo2300* 的研究结果相似, 即缺失该基因后可导致细菌在氧化压力下的存活率降低。在 5% NaCl 条件下, 应激初期 *luxS* 基因缺失株与标准对照株耐受能力相近, 而进入应激后期后, 随着细胞密度升高, 缺失株耐受能力明显

减弱, 这一特征与群体感应依赖密度进行调控的特性一致。胡沛等^[27]通过缺失 *qseC* 及 *luxS* 双基因发现, 该菌株对宿主及环境的适应能力整体显著下降, 包括毒力、荚膜产量和抗逆能力等多方面, 表明 QS 系统相关基因在维持细菌生存竞争力中不可或缺。运动能力试验中 3 株菌未表现出显著差异, 表明缺失 *luxS* 基因对细菌运动能力的影响较为有限。细菌运动性通常与鞭毛结构及其相关调控基因的表达密切相关^[28], 而 *luxS* 主要参与 AI-2 介导的群体感应信号合成, 其调控作用更多体现在生物被膜形成、细胞间信号传递及环境适应性等方面, 因此 *luxS* 基因缺失并未明显改变细菌的运动表型。

已有研究报道, 当 LuxS/AI-2 信号通路受到影响时生物被膜形成能力将明显下降, 相关毒力表型也会受到抑制^[29]。作为该通路核心的 *luxS* 基因不仅负责 AI-2 前体分子 4,5-二羟基-2,3-戊二酮 (4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione, DPD) 的合成, 还通过参与甲硫氨酸循环将代谢稳态与群体感应过程相互连接^[30]。因此, *luxS* 的缺失不仅会导致 AI-2 浓度降低和细胞间通讯受阻, 还可能通过改变代谢通路影响胞外多糖和胞外蛋白的合成, 从而在一定程度上影响生物被膜的形成与结构稳定^[31]。Zhang 等^[32]研究发现, 缺失 *pgpH* 基因可影响生物被膜的形成, 这可能与该基因改变生化代谢从而削弱基质合成有关。生物被膜的形成是一个动态过程, 通常包括初始附着、微菌落形成、成熟及解离分散 4 个阶段, 其中早中期阶段依赖于细菌表面结构及胞外聚合物的合成调控^[33]。本研究结果显示, 缺失株在培养 24 h 和 48 h 后生物被膜量显著降低, 而培养 72 h 后 3 株菌差异不显著。进一步检测胞外聚合物生成量发现, 培养 48 h 后缺失株相较于标准株和回补株胞外多糖及胞外蛋白含量均不同程度降低, 表明 *luxS* 基因可能通过影响胞外聚合物的生成而调控生物被膜形成; 而培养 72 h 后 3 株菌的胞外多糖和胞外蛋白含量未表现出显著差异, 这可能与生物被

膜在培养后期逐渐进入成熟阶段有关。胞外聚合物作为生物被膜结构的重要组成部分,其含量减少会直接影响细菌表面黏附及生物被膜结构的稳定性^[34]。综上所述,*luxS* 基因可能主要调控生物被膜形成的早期至中期阶段,当生物被膜进入成熟稳定阶段后,其结构维持更多依赖于其他调控系统,从而在一定程度上弥补 *luxS* 缺失带来的影响。此外,RT-qPCR 结果显示,*luxS* 缺失后 QS 系统调控因子 *agrA* 和 *agrB*、生物被膜相关基因 *lmo2504* 及应激调控相关基因 *sigB* 表达均下调,而 *ladR* 基因表达上调。*ladR* 基因属于 PadR 家族转录调控蛋白,可影响生物被膜的形成,本研究中 *ladR* 表达水平上调可能是细菌在 *luxS* 缺失导致群体感应信号受扰后的一种适应性调节。Agr 系统已被证实参与 LM 生物被膜形成的调控,其表达水平降低可能影响细菌间信号传递及胞外基质合成,从而抑制生物被膜早期结构的建立^[35]。对于应激调控因子 SigB,有研究表明其缺失时 LM 生物被膜形成能力下降,进而影响细菌在消毒剂环境下的生存能力^[36]。这可能是本研究中缺失株生物被膜量减少及环境应激耐受能力减弱的原因之一。

鉴于生物被膜被认为是细菌抵御消毒剂的重要屏障^[37],在明确 *luxS* 基因对生物被膜形成影响的基础上,本研究进一步评估了 *luxS* 基因在消毒剂耐受性中的调控作用。消毒剂胁迫试验中 3 株菌的最小抑菌浓度无显著差异,考虑到 *luxS* 基因主要通过 QS 系统参与生物被膜的构建,推测其对消毒剂的影响可能更多体现在生物被膜耐受性方面。基于此,采用 MTT 法评价经 HCHO 溶液、I₂ 溶液和 NaOH 溶液 3 种消毒剂处理后各菌株生物被膜细胞的代谢活性。结果显示,生物被膜培养 48 h 消毒剂处理条件下 3 株菌均表现出细胞代谢活性下降,其中 *luxS* 缺失株较 LM ATCC 19112 标准株与回补株下降更为显著,提示 *luxS* 基因可能在维持生物被膜细胞代谢状态及环境适应能力方面发挥重

要作用。*LuxS* 是细菌群体感应系统的重要组成部分,通过参与 AI-2 信号分子的合成调控生物被膜形成及应激响应相关通路的基因表达。因此,*luxS* 基因缺失可能导致相关调控网络改变,从而降低生物被膜细胞在消毒剂胁迫下的代谢活性与耐受能力。生物被膜培养 72 h 后,3 株菌间代谢活性未表现出显著差异,推测可能与生物被膜进入成熟阶段有关。成熟的生物被膜由菌体细胞及其分泌的胞外聚合物基质共同构成,可形成致密的三维网络结构,不仅为被膜内菌体提供稳定的生存微环境,同时可在一定程度上阻碍消毒剂向生物被膜内部扩散^[38]。结合本研究结果推测,*luxS* 介导的调控网络可能通过影响生物被膜结构形成及应激相关基因的表达,进而调节细胞的代谢活性及其对外界胁迫的响应能力。上述结果表明,*luxS* 基因在细菌应对外界环境压力、维持自身生存稳态的过程中发挥着重要作用。综上所述,本研究加深了对 *luxS* 基因在 LM 环境适应性调控机制中作用的认识,并为后续深入解析其分子调控网络奠定了理论基础。

作者贡献声明

王佳雨: 试验操作、数据分析以及论文的撰写与修改; 曹青: 试验设计、监督管理以及论文指导; 张坤中: 协助构建缺失株和回补株; 崇倩: 初步试验结果整理与记录; 王中龙: 结果分析和数据收集; 王爱爱: 协助生长曲线测定试验; 杨开慧: 协助 RT-qPCR 验证试验操作; 程明霞: 协助胞外聚合物含量测定试验; 汪溪: 协助生物被膜形成试验; 杨璐琦: 实验记录与数据归档; 何佳兵: 数据验证与流程优化; 肖敏: 技术支持、实验条件优化与操作培训; 王子坚: 技术指导、实验标准化与质量控制; 薛惠文: 获取基金以及试验指导; 苟惠天: 获取基金、项目管理以及论文的审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Meireles D, Pombinho R, Cabanes D. Signals behind *Listeria monocytogenes* virulence mechanisms[J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2369564.
- [2] Tuytschaever T, Raes K, Samplers I. *Listeria monocytogenes* in food businesses: from persistence strategies to intervention/prevention strategies: a review[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22(5): 3910-3950.
- [3] Gray JA, Chandry PS, Kaur M, Kocharunchitt C, Bowman JP, Fox EM. Characterisation of *Listeria monocytogenes* food-associated isolates to assess environmental fitness and virulence potential[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 350: 109247.
- [4] Erkihun M, Asmare Z, Endalamew K, Getie B, Kiros T, Berhan A. Medical scope of biofilm and quorum sensing during biofilm formation: systematic review[J]. Bacteria, 2024, 3(3): 118-135.
- [5] Ebenberger SP, Cakar F, Chen YC, Pressler K, Eberl L, Schild S. The activity of the quorum sensing regulator HapR is modulated by the bacterial extracellular vesicle (BEV)-associated protein ObfA of *Vibrio cholerae*[J]. Journal of Extracellular Vesicles, 2024, 13(9): e12507.
- [6] Li JP, Wang YX, Du YB, Zhang H, Fan QY, Sun LY, Yi L, Wang SH, Wang Y. mRNA-Seq reveals the quorum sensing system *luxS* gene contributes to the environmental fitness of *Streptococcus suis* type 2[J]. BMC Microbiology, 2021, 21(1): 111.
- [7] 杨静贤, 王清清, 董小刚, 徐浩婷, 钟青萍. 副溶血性弧菌 *luxS* 缺失株的构建及其生物学特性[J]. 食品科学, 2024, 45(13): 96-103.
Yang JX, Wang QQ, Dong XG, Xu HT, Zhong QP. Construction and biological characteristics of a *luxS*-deleted mutant of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Food Science, 2024, 45(13): 96-103 (in Chinese).
- [8] Lee YJ, Wang C. Links between *S*-adenosylmethionine and Agr-based quorum sensing for biofilm development in *Listeria monocytogenes* EGD-e[J]. MicrobiologyOpen, 2020, 9(5): e1015.
- [9] 张心怡, 陆兆新, 郑雨平, 吕紫岩, 周立邦, 孟凡强, 别小妹. 群体感应系统对单增李斯特菌生物被膜形成的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(18): 105-112.
Zhang XY, Lu ZX, Zheng LP, Lü ZY, Zhou LB, Meng FQ, Bie XM. Effect of quorum sensing systems on biofilm formation by *Listeria monocytogenes*[J]. Food Science, 2022, 43(18): 105-112 (in Chinese).
- [10] 芝吉, 曹青, 赵学慧, 张浩浩, 范子秋, 马永辉, 邓静, 何曾文, 马金锐, 张坤中, 崇倩, 王彩霞, 薛惠文, 苟惠文. 单增李斯特菌 *lmo2363* 基因缺失株的构建及其生物学特性[J]. 中国兽医学报, 2024, 44(9): 1923-1929, 1956 (in Chinese).
Zhi J, Cao Q, Zhao XH, Zhang HH, Fan ZQ, Ma YH, Deng J, He ZW, Ma JR, Zhang KZ, Chong Q, Wang CX, Xue HW, Gou HT. Construction and biological characterization of *lmo2363* gene deletion strain of *Listeria monocytogenes*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2024, 44(9): 1923-1929, 1956 (in Chinese).
- [11] 郭骞, 张钰, 方小伟, 袁梅, 郑明浩, 刘芳, 方春. 双组分系统 *resE/resD* 基因缺失对单增李斯特菌抗渗透压应激能力及其致病性的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(9): 3853-3860.
Guo Q, Zhang Y, Fang XW, Yuan M, Zheng MH, Liu F, Fang C. Effects of two-component system *resE/resD* gene deletion on osmotic stress resistance and pathogenicity of *Listeria monocytogenes*[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(9): 3853-3860 (in Chinese).
- [12] Zhang DX, Li Y, Yang XQ, Su HY, Wang Q, Zhang ZH, Liu YC, Tian CL, Cui CC, Liu MC. *In vitro* antibiotic susceptibility, virulence genes distribution and biofilm production of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in the Liaoning Province of China[J]. Infection and Drug Resistance, 2020, 13: 1365-1375.
- [13] 朱黄琛之, 韩周愈, 孙宇, 莫秋芬, 陈刚, 杨梦华, 许光治. *mfpA* 突变对副溶血性弧菌运动性和生物被膜形成的影响[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 3075-3088.
Zhu H, Han ZY, Sun Y, Mo QF, Chen G, Yang MH, Xu GZ. Influences of *mfpA* mutation on the motility and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(7): 3075-3088 (in Chinese).
- [14] 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.
Chen YT. Genetic diversity analysis and the effect of *LadR* on biofilm formation of *Listeria monocytogenes*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [15] 陈月桃, 陈谋通, 吴清平, 张菊梅, 程健恒, 孙奇凡, 王涓. 单核细胞增生李斯特菌 *ladR* 基因在两种原核表达载体中的克隆表达及纯化分析[J]. 现代食品科技, 2019, 35(10): 58-65.
Chen YT, Chen MT, Wu QP, Zhang JM, Cheng JH, Sun QF, Wang J. Expression and purification of *ladR* gene of *Listeria monocytogenes* in two prokaryotic vectors[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(10): 58-65 (in Chinese).
- [16] Cui HY, Li H, Abdel-Samie MA, Surendhiran D, Lin L. Anti-*Listeria monocytogenes* biofilm mechanism of cold nitrogen plasma[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2021, 67: 102571.
- [17] Xia J, Jiang G, Luo YR, Wang Z, Li JJ, Fu ZH, Qin Q, Xu JL, Deng SM, Chen MM, Han Y, Jiang LL, Song HH, Cheng CY. Beyond antimicrobial resistance: MATE-type efflux pump FepA contributes to flagellum formation and virulence in *Listeria monocytogenes*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2025, 91(7): e0046225.
- [18] Zong BB, Xiao Y, Wang PY, Liu W, Ren MX, Li CY, Fu SL, Zhang YY, Qiu YS. Baicalin weakens the virulence of porcine extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* by inhibiting the LuxS/AI-2 quorum-sensing system[J]. Biomolecules, 2024, 14(4): 452.
- [19] Wang Y, Wang YX, Sun LY, Grenier D, Yi L. The LuxS/AI-2 system of *Streptococcus suis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(17): 7231-7238.
- [20] Wang Y, Liu BB, Li JP, Gong SL, Dong X, Mao CL, Yi

- L. LuxS/AI-2 system is involved in fluoroquinolones susceptibility in *Streptococcus suis* through overexpression of efflux pump SatAB[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 233: 154-158.
- [21] Kaur A, Capalash N, Sharma P. Expression of *Meiothermus ruber luxS* in *E. coli* alters the antibiotic susceptibility and biofilm formation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(10): 4457-4469.
- [22] Vázquez L, Parra A, Quesille-Villalobos AM, Gálvez G, Navarrete P, Latorre M, Toro M, González M, Reyes-Jara A. Cobalamin *cbiP* mutant shows decreased tolerance to low temperature and copper stress in *Listeria monocytogenes*[J]. *Biological Research*, 2022, 55: 9.
- [23] 汪国俊, 黄金梅, 栗绍文, 刘梅. LisK/R通过调控鞭毛基因表达影响单增李斯特菌低温生长[J]. *微生物学报*, 2025, 65(7): 2889-2902.
Wang GJ, Huang JM, Li SW, Liu M. LisK/R plays a role in *Listeria monocytogenes* growth at low temperatures by regulating the expression of flagellar genes[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(7): 2889-2902 (in Chinese).
- [24] Wu YS, Pang XX, Liu XY, Wu YJ, Zhang XL. Functional genomics identified novel genes involved in growth at low temperatures in *Listeria monocytogenes*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(4): e00710-22.
- [25] Kannan S, Balakrishnan J, Govindasamy A. *Listeria monocytogenes*: amended understanding of its pathogenesis with a complete picture of its membrane vesicles, quorum sensing, biofilm and invasion[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 149: 104575.
- [26] 张晓芸, 高宇杰, 葛同鑫, 王温馨, 许浩男, 宋若菲, 宋厚辉, 程昌勇, 韩月. 单增李斯特菌 *lmo2300* 介导的氧化应激和感染生物学作用[J]. *微生物学报*, 2025, 65(9): 3946-3958.
Zhang XH, Gao YJ, Ge TX, Wang WX, Xu HN, Song RF, Song HH, Cheng CY, Han Y. Oxidative stress resistance and infection mediated by *lmo2300* of *Listeria monocytogenes*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(9): 3946-3958 (in Chinese).
- [27] 胡沛, 彭旭, 程丹, 李甜, 王媛媛, 高丽旭, 袁祥, 彭远义, 李能章. *qseC* 及 *luxS* 双基因缺失对多杀性巴氏杆菌毒力及其交叉免疫保护性的影响[J]. *中国兽医学报*, 2023, 43(10): 2062-2071.
Hu P, Peng X, Cheng D, Li T, Wang YY, Gao LX, Yuan X, Peng YY, Li NZ. Effects of dual-deletion of *qseC* and *luxS* gene on virulence and cross-protection in *Pasteurella multocida*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2023, 43(10): 2062-2071 (in Chinese).
- [28] Li J, Qiao MF, Zhang XX, Li J, Meng QL, Qiao J, Li Y, Wang XT, Zhang GW, Zhang K, Wang LX, Cai XP. Effects of *Lmo2672* deficiency on environmental adaptability, biofilm formation, and motility of *Listeria monocytogenes*[J]. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2020, 13(5): e95758.
- [29] Rotta IS, da Cunha Rezende SD, Perini HF, da Silva MV, de Almeida FA, Pinto UM, Ferreira Machado AB, Paiva AD. Exploring the potential of *Weissella paramesenteroides* UFTM 2.6.1 in disrupting quorum sensing and attenuating virulence in *Listeria monocytogenes*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2025, 16: 1601203.
- [30] Niu C, Robbins CM, Pittman KJ, Osborn JL, Stubblefield BA, Simmons RB, Gilbert ES. LuxS influences *Escherichia coli* biofilm formation through autoinducer-2-dependent and autoinducer-2-independent modalities[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013, 83(3): 778-791.
- [31] Tang MR, Zhao DY, Zhang Y, Qian CR, Chen HL, Chen LJ, Ye JZ, Zhou TL. Impact of LuxS on virulence and pathogenicity in *Klebsiella pneumoniae* exhibiting varied mucoid phenotypes[J]. *Infection and Immunity*, 2024, 92(3): e0001224.
- [32] Zhang XY, Zheng LP, Lu ZX, Zhou LB, Meng FQ, Shi CZ, Bie XM. Biochemical and molecular regulatory mechanism of the *pqpH* gene on biofilm formation in *Listeria monocytogenes*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2023, 134(2): lxac086.
- [33] Hua Z, Zhu MJ. Comprehensive strategies for controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2024, 23(3): e13348.
- [34] Colagiorgi A, di Ciccio P, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. A look inside the *Listeria monocytogenes* biofilms extracellular matrix[J]. *Microorganisms*, 2016, 4(3): 22.
- [35] Rieu A, Weidmann S, Garmyn D, Piveteau P, Guzzo J. *agr* system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(19): 6125-6133.
- [36] Van der Veen S, Abec 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.
- [37] Byun KH, Han SH, Choi MW, Kim BH, Ha SD. Efficacy of disinfectant and bacteriophage mixture against planktonic and biofilm state of *Listeria monocytogenes* to control in the food industry[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 413: 110587.
- [38] Skowron K, Walecka-Zacharska E, Grudlewska K, Gajewski P, Wiktorczyk N, Wietlicka-Piszc M, Dudek A, Skowron KJ, Gospodarek-Komkowska E. Disinfectant susceptibility of biofilm formed by *Listeria monocytogenes* under selected environmental conditions[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(9): 280.