



副溶血性弧菌生物被膜形成及其调控机制研究进展

蒋富凤^{1,2#}, 雷涛^{2#}, 吴清平^{2*}, 张菊梅², 庞锐²

¹陕西科技大学食品与生物工程学院, 陕西 西安 710021

²广东省微生物研究所, 广东省科学院, 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, 广东 广州 510070

摘要: 副溶血性弧菌是一种广泛存在于海产品中并可引起人类急性肠胃炎的食源性致病菌。该菌形成的生物被膜能够增强体外环境中的存活率, 促进对宿主的定殖和感染, 还会导致被污染的加工设备与食物之间发生交叉感染。深入了解生物被膜形成背后的调控机制, 有助于制定有针对性的策略, 干扰其适应环境变化的过程, 从而降低副溶血性弧菌对人类的危害。本文主要综述了鞭毛、菌毛和胞外的多糖等基质组分在生物被膜形成中的作用以及c-di-GMP和群体感应对生物被膜形成的调控。

关键词: 副溶血性弧菌, 生物被膜, 调控机制

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种世界范围的海洋细菌, 也是引起食物中毒的重要病原菌之一, 尤其盛行于夏秋季节的沿海地区。人类被该菌感染以后, 容易引起腹泻、恶心、呕吐、发热等症状, 严重时还会引发败血症甚至死亡。根据我国 2018 年和 2019 年食品安全风险监测和卫生健康监督统计年报显示, 微生物居引发食源性疾病的各类致病因素的第一位, 其中 VP 已超过沙门氏菌居食源性病原菌之首^[1]。随

着广谱抗菌药物的大量使用, 多重耐药的 VP 的检出率越来越高, 其耐药性的产生与生物被膜形成密切相关^[2]。

细菌生物被膜是指细菌粘附于介质表面, 以精细的方式将细菌自身包裹于自身产生的多糖、蛋白质和胞外 DNA 等基质而组成的三维结构性细菌群落。自然环境中, 超过 99.9% 的细菌以生物被膜的形式存在, 且 65% 的人类细菌性感染都与生物被膜的形成有关^[3]。VP 能够在生物(虾、蟹、

基金项目: 国家重点研发专项(2017YFC1600100); 广东省科技计划(2017B020207007); 广东省自然科学基金(2016A030310316); 广东省科学院实施创新驱动发展能力建设专项(2017GDASCX-0201)

#共同第一作者。

*通信作者。Tel/Fax: +86-20-87688132; E-mail: wuqp203@163.com

收稿日期: 2020-01-15; 修回日期: 2020-02-27; 网络出版日期: 2020-04-16

牡蛎等)及非生物表面(厨房切菜板、不锈钢等食品加工设备等)形成生物被膜,甚至可以黏附到人体肠道细胞系上,造成交叉感染,同时引发相应的疾病。在感染过程中,VP的运动(游动和爬动)有助于黏附进而加快生物被膜形成^[4],与宿主紧密接触后开始分泌毒素蛋白并将 III 型分泌系统效应分子传递给宿主细胞,从而诱导细胞毒性和肠毒性^[5]。

本实验室在 2012–2016 年间对全国 12 个城市的 784 份零售即食食品进行污染调查,发现 VP 阳性率为 20.79%^[6]。VP 能够对食品安全造成重大威胁,生物被膜在此过程中发挥着重大的作用。本实验室利用差异蛋白质组学比较浮游态和生物被膜态菌体蛋白,筛选出一批与生物被膜形成相关的基因,并对其通路进行初步的富集,同时对通路中的关键基因进行敲除和表型验证,发现部分基因能够通过影响 VP 的运动性、胞外多糖的产生等途径去影响 VP 生物被膜的形成。VP 的生物被膜形成是一个非常复杂的过程,除了鞭毛、菌毛、荚膜多糖、胞外多糖等直接参与到生物被膜形成,还受到群体感应、相关信号分子和一些转录调控分子的调控。本文从 VP 生物被膜的基质组分及相关结构出发,主要综述了群体感应、相关信号分子以及部分重要转录调控分子对生物被膜形成的调控机理。

1 副溶血性弧菌生物被膜的组成及相关结构

1.1 鞭毛在生物被膜形成中的作用

鞭毛是细菌的一种运动性结构,在细菌黏附、生物被膜形成、信号传导、胞外多糖产生等方面

具有重要作用^[7]。在细菌初始定殖期,鞭毛介导的运动能够增加细菌接触表面的可能性以此启动细菌的黏附和聚集,进而促进生物被膜的形成;初始定殖完成后,与运动相关的基因表达关闭,而鞭毛则作为生物被膜支架来稳定生物被膜使之能容纳更多的细菌细胞。虽然不同细菌的鞭毛行使的功能具有高度的相似性,但是编码鞭毛蛋白的开放阅读框(ORF)的排列、数量和功能上具有明显的差异。鞭毛蛋白大致可分为两种类型:一种是鞭毛组成型蛋白,直接参与鞭毛的组装;另一种是鞭毛蛋白同源蛋白,既不参与运动也不参与鞭毛组装,但两类蛋白会以不同的作用途径影响生物被膜的形成。Enos-Berlage 等研究结果显示,VP 的极性鞭毛基因 *flgD* 和 *flgE* 缺失之后,在气液表面上的生物被膜形成能力显著降低,生物被膜发育被阻止在单层阶段,且无法通过延长生长时间来克服这种缺陷^[8];鞭毛蛋白同源蛋白 FlaE 和 FlaF 虽不参与鞭毛细丝的组成,但合成后会被分泌到胞外环境,通过与胞外多糖相互作用,从而影响生物被膜的形成^[9],然而这种相互作用机制目前仍不清楚。此外, σ 因子也决定 VP 鞭毛的形成,Whitaker 等研究发现把决定 VP 鞭毛形成的 σ 因子 *rpoN* 进行敲除,会导致菌株无法形成鞭毛,同时丧失运动和聚集能力,从而减少生物被膜形成,甚至形成缺陷型生物被膜^[10]。由此说明,鞭毛在 VP 生物被膜形成的初期和后期都发挥着重要作用。从 KEGG 数据库可知,存在大量与 VP 鞭毛各部分组成相关的基因簇,但是,这些基因簇是否影响以及如何影响 VP 的生物被膜形成能力还需要进一步研究。

1.2 菌毛在生物被膜形成中的作用

菌毛作为一种暴露在介质表面的蛋白质纤

维,通过对介质表面的粘附和聚集,在 DNA 转移、噬菌体结合、微菌落和生物被膜形成、运动和发育等生命活动中起着关键作用。VP 的生物被膜形成过程涉及的菌毛包括 I 型和 IV 型两类。VP 中的 IV 型菌毛研究较为透彻,该菌基因组主要编码两种 IV 型菌毛基因,一种是甘露糖敏感性血凝素菌毛 (MSHA), 另一种是几丁质调节菌毛 (ChiRP)^[11]。通过构建这两种菌毛的缺失株/回补株发现,ChiRP 在生物被膜形成过程中使菌体凝集,加快生物被膜形成; MSHA 有助于菌体粘附到物体表面,并能够产生将几丁质分解成 GlcNAc 的几丁质酶,同时促进 ChiRP 的表达,加强细菌间的相互作用,表明 VP 中的两种 IV 型菌毛以不同的方式促进了生物被膜的形成^[12]; Alisha 等研究发现把 VP 中的 I 型菌毛基因缺失以后,生物被膜形成也存在类似的缺陷^[13]。

生物被膜形成与菌毛密切相关,位于进化树同一分支上的菌毛基因与生物被膜间是否存在某种对应关系呢? Aagesen 等试图从等位基因多样性去探索菌毛基因、生物被膜形成和牡蛎黏附之间的关系时却发现编码菌毛的基因亲缘关系的远近与生物被膜形成能力以及黏附能力之间并不存在一种线性关系^[11],因此这种等位基因多样性的机制在生物被膜形成中尚未得到阐明,那么菌毛等位基因多样性与生物被膜形成之间的关系还需继续研究。

1.3 生物被膜的重要组分: 多糖

多糖可协助生物被膜中的细胞粘附到介质表面,并形成一定的空间结构,从而保护生物被膜中的细胞。多糖在生物被膜中能起到“分子胶”的作用,使细菌细胞能够彼此粘附并附着于介质表面。粘附力使细菌能够抵抗流体运动所施加的物

理压力,从而促进了生物表面和非生物表面的定殖^[14]。多糖还可以提供保护作用,使细胞免受各种环境压力、噬菌体和免疫系统的伤害。最后,多糖可以为生物被膜提供一定的空间结构,从而使细菌群落分层并建立营养和代谢产物的梯度^[14]。

细菌胞外的多糖主要包括多种组分,如胞外多糖(EPS)、脂多糖(LPS)和荚膜多糖(CPS)等,通过研究创伤弧菌发现这 3 种多糖以不同的方式参与细菌生物被膜的组成,EPS 和 LPS 突变体的生物被膜形成量显著下降,外源添加 EPS 会增加生物被膜的形成,表明 EPS 在多细胞结构中发挥着“分子胶”的作用以促进生物被膜的成熟;而外源添加 LPS 却减少了生物被膜形成,很可能外源添加的 LPS 与菌体分泌的 LPS 竞争覆盖在物体表面,从而影响生物被膜的形成;相反,CPS 突变体的生物被膜形成量显著增加,外源添加 CPS 后生物被膜形成量回复到野生型水平,CPS 通过降低细胞表面的疏水性、限制成熟生物被膜连续生长来决定生物被膜量^[15]。

在 VP 中,胞外的多糖决定着菌落“不透明-半透明”的转换过程,同时还决定了菌落的形态,编码 VP 中 EPS 合成基因簇 *VP1403-1412 (cpsA-J)* 位于二号染色体上^[16],该基因簇与菌落褶皱性直接相关。而目前无法单独测量 EPS、LPS 或 CPS 的含量,但可以通过菌落的透明度判断 CPS 的相对含量。菌落透明度越高,CPS 含量越低。可以将生物被膜与菌落透明度的表型相关联,即菌落透明度越高,生物被膜形成量越多,其 CPS 含量越低,也间接说明 CPS 抑制生物被膜的形成。目前对 VP 生物被膜基质多糖与生物被膜形成之间的关系研究几乎只涉及到菌落表型上的初步观察,关于其组成和功能的理解留下了较大的空白,

生物被膜的组分除多糖外还有蛋白质和核酸, 很多研究者推测这些大分子通过相互作用来实现特定的、动态的作用。然而现在也缺乏足够的证据来论证这种相互作用的生物学意义。

1.4 生物被膜的重要组分: 蛋白质

生物被膜基质包含大量蛋白质, 其成分包括分泌的胞外蛋白、表面粘附素和细胞附属物(如鞭毛和菌毛)蛋白亚基等。基质蛋白在生物被膜形成和溶解中起着多种作用, 如参与细胞的表面附着、与胞外多糖和核酸成分相互作用来稳定生物被膜基质、促进生物被膜三维结构形成以及通过酶促降解多糖、蛋白质和核酸来溶解生物被膜基质^[17]。霍乱弧菌的基质蛋白包括 RbmA、Bap1 和 RbmC。RbmA 蛋白含有的 2 个 III 型纤连蛋白折叠位点, 能够促进生物被膜的凝聚以及招募细胞聚集黏附到生物被膜中, 由于该蛋白在单层细胞黏附及弧菌多糖产生之后开始积累, 故推测 RbmA 在维持气液界面间薄膜型生物被膜的褶皱和弹性起着重要作用^[18], RbmA 能与其他基质成分和细胞表面产生柔性接触, 提高了生物被膜基质的抗剪切力和完整性。总之, RbmA 在成熟生物被膜结构的形成和生物被膜稳定方面具有重要作用。另外, Bap1 和 RbmC 存在功能部分互补, 也都决定着生物被膜的褶皱、稳定和黏附强度^[19]。铜绿假单胞菌的基质蛋白中研究较多的是凝集素 LecA、LecB 和 Psl 结合基质蛋白 CdrA。凝集素表现出糖的结合特异性, 凝集素的缺失会导致生物被膜的厚度和覆盖率下降^[20], *cdrA* 突变体形成的生物被膜更薄且结构更简单^[21]。因此, 铜绿假单胞菌的生物被膜离不开胞外蛋白质的共同作用。在 VP 中, 鞭毛蛋白同源蛋白 FlaE 和 FlaF (如 1.1 所述)在脱落后作为基质蛋白通过与胞外多糖相互作用影响生物被膜形成, 但是影响生物

被膜的具体途径还不清楚。目前有关生物被膜基质胞外蛋白的研究相对较少, 可以作为以后的一个研究方向。

1.5 生物被膜的重要组分: 胞外 DNA

胞外 DNA (eDNA)是细菌生物被膜基质的关键组分之一, 该成分依赖于细菌主动分泌自溶素裂解囊泡及细菌裂解等方式被释放到胞外, 吸附在菌体表面并开始向外延伸, 以此促进生物被膜的形成。此外, eDNA 能够为细菌代谢提供营养物质, 能与胞外蛋白和胞外多糖等其他基质组分交联, 维持生物被膜的空间结构^[22]。例如, 铜绿假单胞菌生物被膜中的阳离子胞外多糖 Pel 与 eDNA 交联促进基质结构的完整^[23], DNAB II 通过稳定 eDNA 的二级结构帮助大肠杆菌形成生物被膜^[24]。虽然 eDNA 是生物被膜中的重要组分, 但是目前尚未发现有关 VP 生物被膜中 eDNA 的报道。

2 生物被膜形成的调控因子及通路

2.1 c-di-GMP 对生物被膜形成的调控

环二鸟苷酸(c-di-GMP)存在于约 85%的细菌中, 是菌体黏附、生物被膜基质产生以及菌体在“浮游态”和“生物被膜态”之间相互转化的核心调控因子, 其代谢受到含有 GGDEF 和 EAL 结构域蛋白的调节。c-di-GMP 是由包含一个 GGDEF 结构域的鸟苷酸环化酶(DGCs)合成; 同时, 又会被包含一个 EAL 或者 HD-GYP 结构域的磷酸二酯酶(PDEs)降解, 还有可能被具有潜在 PDEs 活性的蛋白所降解。

高浓度的 c-di-GMP 通过与效应蛋白分子的不同结构域相互作用, 使细菌具有特异的调控功能, 如调节黏附素和生物被膜基质组分的合成, 下调

鞭毛蛋白的表达,降低运动能力或者干扰鞭毛的运动功能。荧光假单胞菌中, c-di-GMP 能与内膜效应蛋白 LapD 的 EAL 结构域结合, 结合后再与 LapG 相互作用阻止了 LapG 对细胞表面黏附素 LapA 裂解和释放, 促使生物被膜的形成^[25]。在大肠杆菌中, c-di-GMP 与效应蛋白 YcgR 的 PilZ 结构域的结合, 刺激 YcgR 与转子 FliG/M 或定子 MotA 的相互作用来影响鞭毛扭矩的产生和旋转偏向, 进而干扰鞭毛运动, 使得细菌从浮游态过渡到生物被膜态^[26]。霍乱弧菌中, c-di-GMP 与效

应蛋白 VpsT (一种转录调节因子)的结合可诱导寡聚, 这是生物被膜重要基质组分弧菌多糖(VPS)基因的 DNA 识别和转录调控所必需的^[27-28]。

VP 中的 c-di-GMP 受到 *scrABC* 操纵子、CpsS-CpsR-CpsQ 级联和基因 *scrG* 的调控(图 1)。*scrABC* 操纵子能够编码 3 种蛋白 ScrA、ScrB、ScrC。ScrA 是一种磷酸吡哆醛依赖型的氨基转移酶, 能产生 S 信号。S 信号是一种自诱导因子信号分子, 能与周质依赖蛋白 ScrB 发生相互作用, 使 ScrC 酶的 EAL 结构域表现出 PDEs 的活性, 将

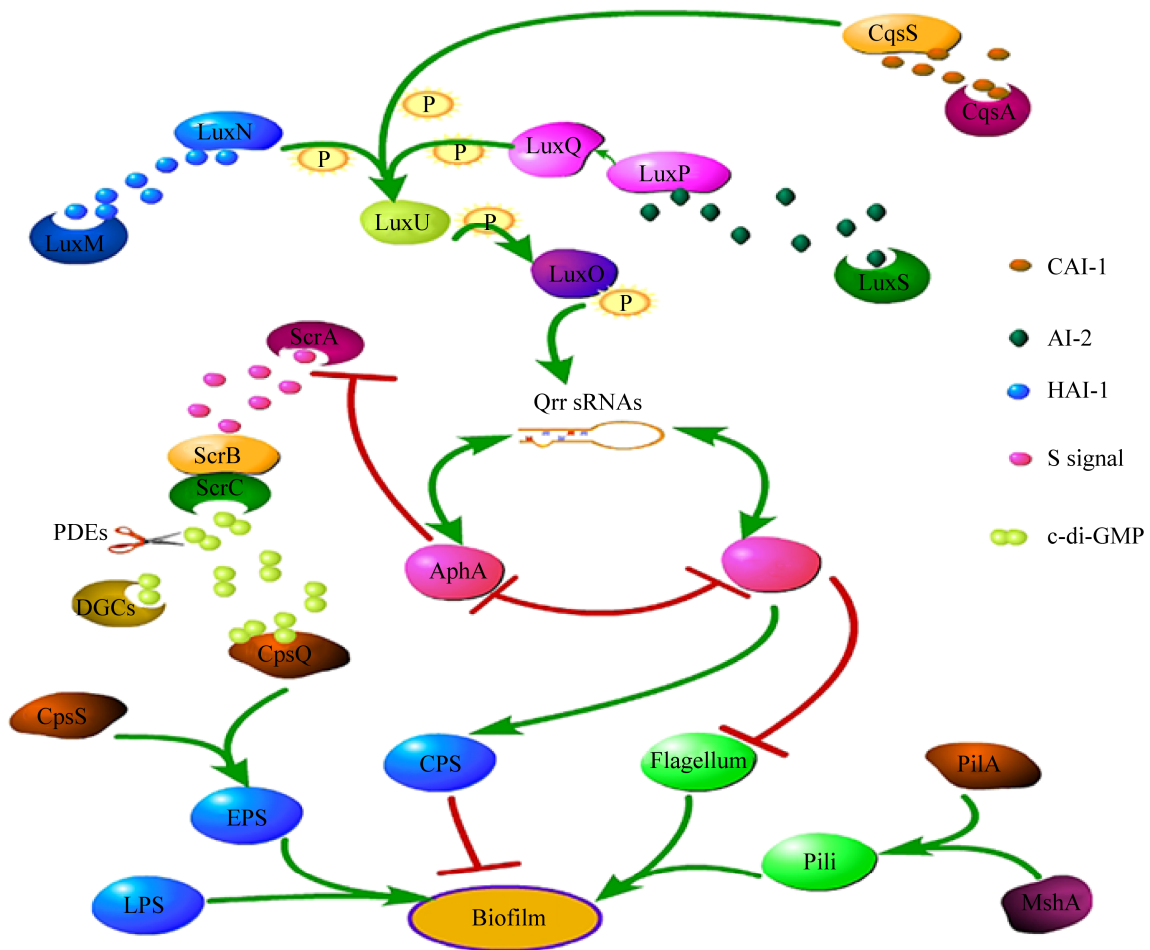


图 1. 副溶血性弧菌生物被膜调控网络

Figure 1. The regulatory network of biofilm in *Vibrio parahaemolyticus*. The green arrow indicates the promoting effect, while the red arrow as inhibition. When the concentration of S signal is low, the ScrC protease promotes the synthesis of c-di-GMP, and conversely, inhibits the synthesis of c-di-GMP.

c-di-GMP 降解, 同时激活鞭毛基因 *laf* 并抑制多糖基因 *cps* 的表达; 当 S 信号处于低浓度时, ScrC 酶的 GGDEF 结构域将发挥 DGCs 的作用, 促进 c-di-GMP 合成, *scrABC* 操纵子突变后, 菌体爬动能力丧失并且呈现出皱缩的菌落形态, 比野生型菌株有更强的成膜能力^[29]。为了探索 ScrABC 网络的影响范围, Ferreira 等对野生株与突变株进行转录组学分析, 发现 80 个基因被下调, 其中包括所有的 *laf* 基因, 均属于表面诱导型基因^[30]; 约有 30 个基因被上调, 其中包括细胞表面组分的编码基因, 如 *mfp* 操纵子编码的膜融合蛋白对生物被膜的形成至关重要。此外, 在 *scrABC* 突变体的上调基因簇中包含一个特有的转录调控因子 VPA1446, 即 CpsQ, 其编码基因位于 *cpsS* 和 *mfpABC* 操纵子之间, CpsQ 与 c-di-GMP 结合后直接激活 *cpsA* 和 *mfpABC* 操纵子的表达, 对生物被膜形成具有促进作用^[31] (图 1)。但是 c-di-GMP 结合 CpsQ 的机制是否与霍乱弧菌的 VpsT 相似, 以及 c-di-GMP 结合是否诱导 CpsQ 寡聚还有待确定。此外, 现在的报道很少涉及 VP 中 c-di-GMP 对生物被膜调控机制的研究, 而主要集中在部分基因和通路对 c-di-GMP 的调节, 从而影响到生物被膜的形成。因此, 我们可以从 c-di-GMP 作用的效应蛋白入手, 寻找 c-di-GMP 影响生物被膜的作用途径。

2.2 群体感应系统对生物被膜形成的调控

决定细菌生物被膜形成能力的另一个重要因素是群体感应(quorum sensing, QS)。细菌密度不同, 所处状态不同, 受到群体感应的调控不同, 细菌的成膜能力也不相同, 该调控机制是通过产生、释放自诱导因子(autoinducers, AIs), 并通过

AIs 浓度改变细胞密度以及相关基因的表达水平, 这些基因的产物从生物被膜发育的不同阶段去调控生物被膜的形成。VP 具有 4 种不同类型的 QS 系统: (1) 利用酰基高丝氨酸内酯(Acyl-homoserine lactones, AHLs)为信号分子的 LuxM/N QS 系统, 由 LuxN 感应信号分子; (2) 利用 CAI-1 自我诱导因子的 CqsA/S 系统, 由 CqsS 感应信号分子; (3) 利用 AI-2 自诱导因子, 由 LuxS 合成信号分子, 由 LuxP/Q 感应信号分子; (4) 利用 NO 分子, 由 H-NOX 感应信号分子。其中, 本实验室吴葵等进一步发现了 VP 中 VanM (LuxM)合成的 AHLs 信号分子为 3-OH-C4-HSL 和 3-OH-C10-HSL^[32]。

在 VP 中, 自诱导因子产生后扩散穿过细胞膜再与膜上的受体蛋白结合。当菌体处于低密度时, 与膜受体蛋白结合的自诱导因子浓度太低, 受体蛋白充当激酶磷酸化磷酸转移蛋白 LuxU (LuxU~P), LuxU~P 再把磷酸基团传递给 LuxO (LuxO~P), LuxO~P 去促进 Qrr sRNA 转录, 转录后的 Qrr sRNA 再促进转录因子 AphA 的翻译并与 AphA 一起抑制 OpaR 的翻译, VP 胞外多糖基质的产生和生物被膜的形成也需要 AphA。虽然 AphA 是生物被膜形成的激活因子, 但它直接抑制 MfpABC 的表达, MfpABC 被认为是一种膜融合转运蛋白, 在 VP 生物被膜发育中起着重要作用, 此过程说明生物被膜的形成过程是一个受多因素影响的过程。当自诱导因子在胞外环境大量积累时, 受体蛋白结合自诱导因子后转化为磷酸酶, 通过调节回路中的磷酸盐使 LuxO 被去磷酸化, 不再表达 Qrr sRNA, 因此, AphA 不再产生, 此时 OpaR 开始积累^[33], OpaR 直接参与调节 VP 中编码含 GGDEF 和 EAL 结构域蛋白的多个基因转录来

抑制生物被膜的形成并促使生物被膜分散^[34]。OpaR 和 AphA 是 VP 群体感应的两个核心调控因子, 可以调节包括许多与运动性、表面感知、生物被膜形成和毒力有关的基因^[35]。由于 QS 调控网络通常很复杂, 涉及许多基因的参与, 要清楚地了解 QS 是如何启动生物被膜形成以及如何引起生物被膜扩散的并不容易。

3 讨论

VP 生物被膜形成是一个众多因素参与的复杂调控过程。近年来, VP 生物被膜形成的关键调控途径已取得一些进展, 在建立细胞与细胞、细胞与介质表面的相互关系时离不开鞭毛、菌毛等运动结构的参与。鞭毛和菌毛的缺失导致 VP 生物被膜的形成量减少或者结构缺陷。目前的研究通过表面现象的观察阐明了鞭毛和菌毛在生物被膜形成初期的作用, 在定殖后期两者又发挥着怎样的作用呢? 是充当黏附素、充当生物被膜支架还是其他情况仍需进一步确证。

成熟的生物被膜依赖于胞外基质组分多糖、蛋白质和核酸, 目前关于多糖的研究报道较多, 而 VP 中的多糖研究主要集中于荚膜多糖基因的表达。另外, 弧菌的多糖组分还包括 VPS、EPS、LPS、共生多糖等, VP 是否也存在这些组分以及各组分的功能如何仍不清楚, 加之蛋白质和核酸等基质组分的调控过程几乎没有研究。因此, 我们今后可以从胞外基质成分组成及其功能等方面进行研究。

第二信使 c-di-GMP 结合并诱导效应蛋白分子发生构象变化、转录激活、DNA 结合、蛋白质-蛋白质相互作用、基因抑制、定位和酶促活性增强。

c-di-GMP 影响效应蛋白分子功能的机制的多样性表明, 效应蛋白分子能够影响各种输出, 例如运动性、生物被膜形成、毒力、细胞周期调控、RNA 加工、基因表达以及可能的其他尚未发现的过程。虽然有研究报道 CpsQ 能够结合 c-di-GMP 促进荚膜多糖基因的表达, 但是该过程的信号传导机制仍是一个空白。挖掘 VP 中 c-di-GMP 的效应分子, 有助于了解信号输出机制, 找到 c-di-GMP 影响生物被膜形成背后的调控途径。

当附着的细菌分裂并形成微菌落时, 种群密度增加, 群体信号达到足够的水平, 从而以协调的方式激活生物被膜的成熟和分解。近年来又发现许多重要的小分子如 QsvR、H-NS 等参与到 QS 系统中, 研究这些小分子有利于开发针对 QS 的靶向小分子防控方法来抑制生物被膜的形成。

生物被膜是细菌难以清除、在临床上引发慢性及持续性感染的重要原因之一, 寻找调控生物被膜形成的关键基因有望减弱细菌的抗逆能力, 从而减弱其对人类健康构成的威胁。本实验室现已发现一批与生物膜形成相关基因, 后期我们将进行多组学分析, 进一步挖掘这些基因涉及的调控和代谢通路, 为从生物被膜形成的调控途径开发控制 VP 污染和危害的方法奠定理论基础。

参考文献

- [1] 国家卫生健康委员会. 中国卫生健康统计年鉴 2019. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2019.
- [2] Ashrafudoulla M, Mizan MFR, Park H, Byun KH, Lee N, Park SH, Ha SD. Genetic relationship, virulence factors, drug resistance profile and biofilm formation ability of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from mussel. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 513.
- [3] Jia B, Zong L, Lee JY, Lei J, Zhu Y, Xie H, Clemens JL, Feller MC, Na Q, Dong J, McLane MW, Jones-Beatty K,

- Burd I. Maternal supplementation of low dose fluoride alleviates adverse perinatal outcomes following exposure to intrauterine inflammation. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 2575.
- [4] Zhu SW, Kojima S, Homma M. Structure, gene regulation and environmental response of flagella in *Vibrio*. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 410.
- [5] Park KS, Ono T, Rokuda M, Jang MH, Okada K, Iida T, Honda T. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, 2004, 72(11): 6659–6665.
- [6] Lei T, Jiang FF, He M, Zhang JM, Zeng HY, Chen MT, Pang R, Wu S, Wei L, Wang J, Ding Y, Wu QP. Prevalence, virulence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of fluoroquinolone resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from different types of food samples in China. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 317: 108461.
- [7] Aschtgen MS, Brennan CA, Nikolakakis K, Cohen S, McFall-Ngai M, Ruby EG. Insights into flagellar function and mechanism from the squid-vibrio symbiosis. *npj Biofilms and Microbiomes*, 2019, 5: 32.
- [8] Enos-Berlage JL, Guvener ZT, Keenan CE, McCarter LL. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(4): 1160–1182.
- [9] Jung YC, Lee MA, Lee KH. Role of flagellin-homologous proteins in biofilm formation by pathogenic *vibrio* species. *mBio*, 2019, 10(4): e01793-19.
- [10] Whitaker WB, Richards GP, Boyd EF. Loss of sigma factor RpoN increases intestinal colonization of *Vibrio parahaemolyticus* in an adult mouse model. *Infection and Immunity*, 2014, 82(2): 544–556.
- [11] Aagesen AM, Phuvasate S, Su YC, Häse CC. Characterizing the adherence profiles of virulent *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Microbial Ecology*, 2018, 75(1): 152–162.
- [12] Shime-Hattori A, Iida T, Arita M, Park KS, Kodama T, Honda T. Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 264(1): 89–97.
- [13] Aagesen AM, Phuvasate S, Su YC, Häse CC. Persistence of *Vibrio parahaemolyticus* in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, is a multifactorial process involving pili and flagella but not type III secretion systems or phase variation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(10): 3303–3305.
- [14] Limoli DH, Jones CJ, Wozniak DJ. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(3), doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014.
- [15] Lee KJ, Kim JA, Hwang W, Park SJ, Lee KH. Role of capsular polysaccharide (CPS) in biofilm formation and regulation of CPS production by quorum-sensing in *Vibrio vulnificus*. *Molecular Microbiology*, 2013, 90(4): 841–857.
- [16] Zhang LL, Weng YW, Wu Y, Wang XY, Yin Z, Yang HY, Yang WH, Zhang YQ. H-NS is an activator of exopolysaccharide biosynthesis genes transcription in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 116: 164–167.
- [17] Fong JNC, Yildiz FH. Biofilm matrix proteins. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(2), doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014.
- [18] Wang QM, Ma Y, Liu LJ, Zhu J, Liu Z. Biofilm development and environmental determinants in *Vibrio cholerae*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2017, 33(9): 1533–1546. (in Chinese)
王全民, 马遥, 刘丽钧, 朱军, 刘智. 霍乱弧菌生物被膜发育与环境调控. *生物工程学报*, 2017, 33(9): 1533–1546.
- [19] Absalon C, Van Dellen K, Watnick PI. A communal bacterial adhesin anchors biofilm and bystander cells to surfaces. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(8): e1002210.
- [20] Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, Rosenau F, Jaeger KE. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology*, 2005, 151(5): 1313–1323.
- [21] Borlee BR, Goldman AD, Murakami K, Samudrala R, Wozniak DJ, Parsek MR. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular Microbiology*, 2010, 75(4): 827–842.
- [22] Tai XR, Feng Q, Sun YQ, Guo W, Ge R, Zhou CR. Role of extracellular DNA in the process of formation and

- development of biofilm. *Water Purification Technology*, 2019, 38(11): 54–60. (in Chinese)
- 台喜荣, 冯骞, 孙亚青, 郭文, 葛冉, 周长仁. 胞外 DNA 在生物膜形成及发展过程中的作用. *净水技术*, 2019, 38(11): 54–60.
- [23] Jennings LK, Storek KM, Ledvina HE, Coulon C, Marmont LS, Sadovskaya I, Secor PR, Tseng BS, Scian M, Filloux A, Wozniak DJ, Howell PL, Parsek MR. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(36): 11353–11358.
- [24] Devaraj A, Justice SS, Bakaletz LO, Goodman SD. DNABII proteins play a central role in UPEC biofilm structure. *Molecular Microbiology*, 2015, 96(6): 1119–1135.
- [25] Navarro MVAS, Newell PD, Krasteva PV, Chatterjee D, Madden DR, O'Toole GA, Sondermann H. Structural basis for c-di-GMP-mediated inside-out signaling controlling periplasmic proteolysis. *PLoS Biology*, 2011, 9(2): e1000588.
- [26] Boehm A, Kaiser M, Li H, Spangler C, Kasper CA, Ackermann M, Kaefer V, Sourjik V, Roth V, Jenal U. Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell*, 2010, 141(1): 107–116.
- [27] Boyd CD, O'Toole GA. Second messenger regulation of biofilm formation: breakthroughs in understanding c-di-GMP effector systems. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2012, 28: 439–462.
- [28] Krasteva PV, Fong JCN, Shikuma NJ, Beyhan S, Navarro MVAS, Yildiz FH, Sondermann H, Sondermann H. *Vibrio cholerae* VpsT regulates matrix production and motility by directly sensing cyclic di-GMP. *Science*, 2010, 327(5967): 866–868.
- [29] Gode-Potratz CJ, Kustusich RJ, Breheny PJ, Weiss DS, McCarter LL. Surface sensing in *Vibrio parahaemolyticus* triggers a programme of gene expression that promotes colonization and virulence. *Molecular Microbiology*, 2011, 79(1): 240–263.
- [30] Ferreira RBR, Chodur DM, Antunes LCM, Trimble MJ, McCarter LL. Output targets and transcriptional regulation by a cyclic dimeric GMP-responsive circuit in the *Vibrio parahaemolyticus* Scr network. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(5): 914–924.
- [31] Zhou DS, Yan XJ, Qu F, Wang L, Zhang YQ, Hou J, Hu Y, Li J, Xin SJ, Qiu JF, Yang RF, Mao PY. Quorum sensing modulates transcription of *cpsQ-mfpABC* and *mfpABC* in *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 166(3): 458–463.
- [32] Wu K, Wu QP, Zhang JM, Xu XK. Research on prokaryotic expression of *Vibrio parahaemolyticus vanM* Gene and *N*-acyl-homoserine lactone identification. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(6): 29–35, 128. (in Chinese)
- 吴葵, 吴清平, 张菊梅, 徐晓可. 副溶血性弧菌 *vanM* 基因原核表达及酰基高丝氨酸内酯信号分子鉴定研究. *现代食品科技*, 2015, 31(6): 29–35, 128.
- [33] Ball AS, Chaparian RR, van Kessel JC. Quorum sensing gene regulation by LuxR/HapR Master regulators in *Vibrios*. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(19): e00105-17.
- [34] Zhang YQ, Qiu YF, Tan YF, Guo ZB, Yang RF, Zhou DS. Transcriptional regulation of *opaR*, *qrr2-4* and *aphA* by the master quorum-sensing regulator OpaR in *Vibrio parahaemolyticus*. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34622.
- [35] Lu RF, Osei-Adjei G, Huang XY, Zhang YQ. Role and regulation of the orphan AphA protein of quorum sensing in pathogenic *Vibrios*. *Future Microbiology*, 2018, 13(3): 383–391.

Biofilm formation and regulation mechanism of *Vibrio parahaemolyticus*: progress and trends

Fufeng Jiang^{1,2#}, Tao Lei^{2#}, Qingping Wu^{2*}, Jumei Zhang², Rui Pang²

¹ School of Food and Biological Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, Shaanxi Province, China

² Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Safety and Health, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Academy Sciences, Guangzhou 510070, Guangdong Province, China

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of seafood-borne acute gastroenteritis worldwide, benefits from a sessile biofilm lifestyle that enhances survival outside the host, contributes to host colonization and infectivity but also leads to cross-contamination between processing equipment and foods. Insight into the regulatory circuit underlying biofilm formation may propose targeted strategies to interfere with a process that renders this bacterium remarkably adaptable to changing environments. Here, we mainly demonstrated the regulatory of two mobility structures (flagella, pili), extracellular matrix polysaccharides, the second messenger c-di-GMP and quorum-sensing system that contribute to biofilm formation.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, biofilm, regulation mechanism

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key R&D Program of China (2017YFC1600100), by the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2017B020207007), by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2016A030310316) and by the GDAS' Special Project of Science and Technology Development (2017GDASCX-0201)

[#]Those authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-87688132; E-mail: wuqp203@163.com

Received: 15 January 2020; Revised: 27 February 2020; Published online: 16 April 2020