



Research
Food Safety and Health—Review

阪崎克罗诺杆菌生物膜形成机制及其在食品工业中的控制策略研究

凌娜^{a,b}, Stephen Forsythe^c, 吴清平^{a,*}, 丁郁^d, 张菊梅^a, 曾海燕^a

^a Guangdong Institute of Microbiology & Guangdong Academy of Sciences & State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China & Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbiology Culture Collection and Application & Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, China

^b School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China

^c foodmicrobe.com, Keyworth, NG12 5GY, UK

^d Department of Food Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 January 2019

Revised 23 April 2019

Accepted 7 May 2019

Available online 28 February 2020

关键词

生物膜

控制

阪崎克罗诺杆菌

形成

去除

摘要

阪崎克罗诺杆菌 (*Cronobacter sakazakii*) 是一种食源性条件致病菌, 可引起坏死性肠炎、脑膜炎和婴儿败血症等危及生命的侵袭性疾病。受该菌污染的婴幼儿配方奶粉 (powdered infant formula, PIF) 的潜在风险已引起乳品生产商、监管机构和消费者的广泛关注。*C. sakazakii* 可以在不同食品生产环境和设备表面形成一种保护该菌免受恶劣环境伤害的细胞生长模式——生物膜, 并成为其在食品中持续污染的重要来源。然而, 细菌生物膜由于其耐药特性难以去除。传统的清洗和消毒程序不足以完全控制生物膜, 并且可能会导致进一步的生物膜形成和扩散。因此, 基于纳米技术的药物传递系统、物种间相互作用以及制备来自微生物、天然提取物和噬菌体的抗菌分子等控制生物膜的新技术应运而生。本文将重点阐述 *C. sakazakii* 生物膜形成机制及其潜在的控制策略。

© 2020 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

克罗诺杆菌属 (*Cronobacter* spp.) 由7个具有致病性的菌种组成, 分别为阪崎克罗诺杆菌 (*C. sakazakii*)、丙二酸盐克罗诺杆菌 (*C. malonaticus*)、苏黎世克罗诺杆菌 (*C. turicensis*)、莫金斯克罗诺杆菌 (*C. muytjensii*)、康帝豪提克罗诺杆菌 (*C. condimenti*)、尤尼沃斯克罗诺杆菌 (*C. universalis*) 和都柏林克罗诺杆菌 (*C. dublinensis*), 原先统称为阪崎肠杆菌 (*Enterobacter sakazakii*)。而 *C. sakazakii* 是 *Cronobacter* spp. 中感染性

最强的一个菌种[1]。*Cronobacter* spp. 是一类具有周生鞭毛, 能运动, 在好氧和厌氧条件下均可生长的革兰氏阴性杆菌。该菌可引起各个年龄人群感染, 特别是在新生儿、小于6个月的婴儿和老年人中的感染率较高。由于 *C. sakazakii* 与新生儿严重疾病的感染暴发密切相关, 因此该菌已引起监管当局的高度重视。国际食品微生物标准委员会 (International Commission on Microbiological Specification for Foods, ICMSF) 将 *Cronobacter* 列为“严重危害特定人群生命、引起长期慢性实质性后遗症的一种致病菌”[2]。该菌可导致低出生体重新生儿和年

* Corresponding author.

E-mail address: wuq203@163.com (Q. Wu).

龄小于6个月（断奶前）的婴儿患脑膜炎、坏死性肠炎和呼吸道感染等威胁生命的症状，其中伴有神经后遗症或迅速死亡病症的死亡率为40%~80% [3-7]。此外，*C. sakazakii*也会感染其他年龄人群，尽管已有报道发现该菌可在学生中暴发急性肠胃炎，但其主要的感染人群是免疫功能低下的成年人[8]。该菌可导致成人多种症状，如菌血症、阑尾炎、败血症、骨髓炎、肺炎、脾脓肿、伤口感染和尿路感染[5,9]。

*C. sakazakii*广泛分布于环境中，包括婴幼儿配方奶粉（powdered infant formula, PIF）、蔬菜、即食食品、水、干粮、药用植物、香料和苍蝇[10-19]。由于*Cronobacter*具有强抗干燥能力，能够产生多糖荚膜，并分泌黄色类胡萝卜素色素以保护其抵抗氧自由基的侵害，所以研究者推测该菌的主要自然源可能是植物[20]。此外，在家庭环境[21,22]和食品生产设备[23,24]中也均发现了该菌。

为了适应不同的生长环境，细菌形成称为生物膜（biofilm）的动态空间组织。这是微生物重要的适应性生存策略，食源性病原体可以通过这种策略保护自己免受环境胁迫[25-27]。生物膜中的细菌作为一个群落存在，其生理特性不同于浮游态的细菌。它们在细胞-细胞间进行合作与竞争，相互传递信号分子，并进行基因的水平转移。因此，它们保持“亦敌亦友”的关系[28]。生物膜的独特形态和生理结构因其包含的微生物及驻留的微环境条件而异。细胞在生物膜内的变化是通过感知和响应各种外部环境信号而实现，通过对这些环境信号的交互响应，细菌能够协调其基因表达并适应不断变化的环境。

研究表明，*C. sakazakii*可以附着在硅、乳胶、聚碳酸酯、不锈钢、玻璃、聚氯乙烯等非生物材料表面并形成生物膜[29,30]。值得注意的是，*C. sakazakii*在PIF中的存活和持续污染与该菌引起的感染暴发密切相关。因此，*C. sakazakii*需具有适应PIF严苛的高渗透和强干燥条件的能力。Beuchat等[31]发现，*C. sakazakii*的生物膜态细胞在低湿度条件下比其浮游细胞生存力更强。在奶粉加工厂的环境（空气过滤器、地板、鞋子、卡车、屋顶）和加工设备（滚筒烘干机、空气过滤器）中均能检测到该菌，并且该菌可能会在这些物质上存留几个月。此外，*C. sakazakii*也会在新生儿喂食管上形成生物膜，这可能会增加新生儿获得感染的风险[32]。近期，生物膜状态被认为是细菌的默认生活方式，而浮游态细胞可能只是细菌生命的一个过渡阶段[33]。而食品微生物污染主要

与食品接触面上细菌生物膜的形成有关。整个食品加工链中接触面上的物质可以为生物膜的发展和持留提供坚实的基质，从而难以去除的生物膜将导致食品的细菌污染并对消费者构成潜在的健康风险。因此，如何防控由*C. sakazakii*生物膜引起的食品污染是食品行业亟待解决的共性关键难题。

以往对生物膜的研究重点关注生物膜及控制食品污染的方法研究。近年来，多组学研究和成像技术的快速发展揭示了细菌生物膜内复杂的空间组织及其形成过程，更准确地了解生物膜将为生物膜去除方法的研发提供理论基础。然而，由于目前对*C. sakazakii*的研究仍处于初级阶段，因此，对其生物膜的控制手段尚不明确。本文根据*C. sakazakii*生物膜现有的研究进行系统性的概况，包括生物膜形成机制、传统和创新的生物膜控制策略以应对生物膜面临的挑战，并讨论了如何将这些控制手段应用于食品工业中*C. sakazakii*生物膜的防控。

2. 生物膜形成机制

“防胜于治”，因此，生物膜形成机制的深入研究将对食品生产环境的设计及生物膜防控具有重要意义。生物膜是一种可在各种表面形成，由不同生物聚合物组成的胞外基质所包裹的复杂微生物群集[25]。通过扫描电镜（scanning electron microscopy, SEM）和激光共聚焦显微镜（confocal laser scanning microscopy, CLSM）等手段对*C. sakazakii*生物膜的形成过程进行观察，结果发现这是一个从附着、成熟、扩散到下一轮附着的一系列动态过程。起初，浮游细菌附着在载体表面并分泌大量的胞外聚合物。随着细胞的生长，细菌聚集在一起形成增厚的生物膜，且在72 h时，生物膜的生长达到最大值。而当生长到96 h时，生物膜已脱离介质表面并释放细菌（图1）。由此可见，*C. sakazakii*生物膜的整体形成过程与其他细菌相似[34]。该菌拥有多种能实现细胞间通信的分子机制，将细胞附着在非生物表面并成长为有弹性的结构，从而形成生物膜。

2.1. 影响 *C. sakazakii* 生物膜发育的环境因素

2.1.1. 培养条件

生物膜的形成是一个受环境变化影响的复杂过程。*C. sakazakii*生物膜形成能力和胞外多糖（extracellular polymeric substances, EPS）的分泌因环境条件的不同而改变，包括接触面性质、营养有效性和相对湿度[35]。

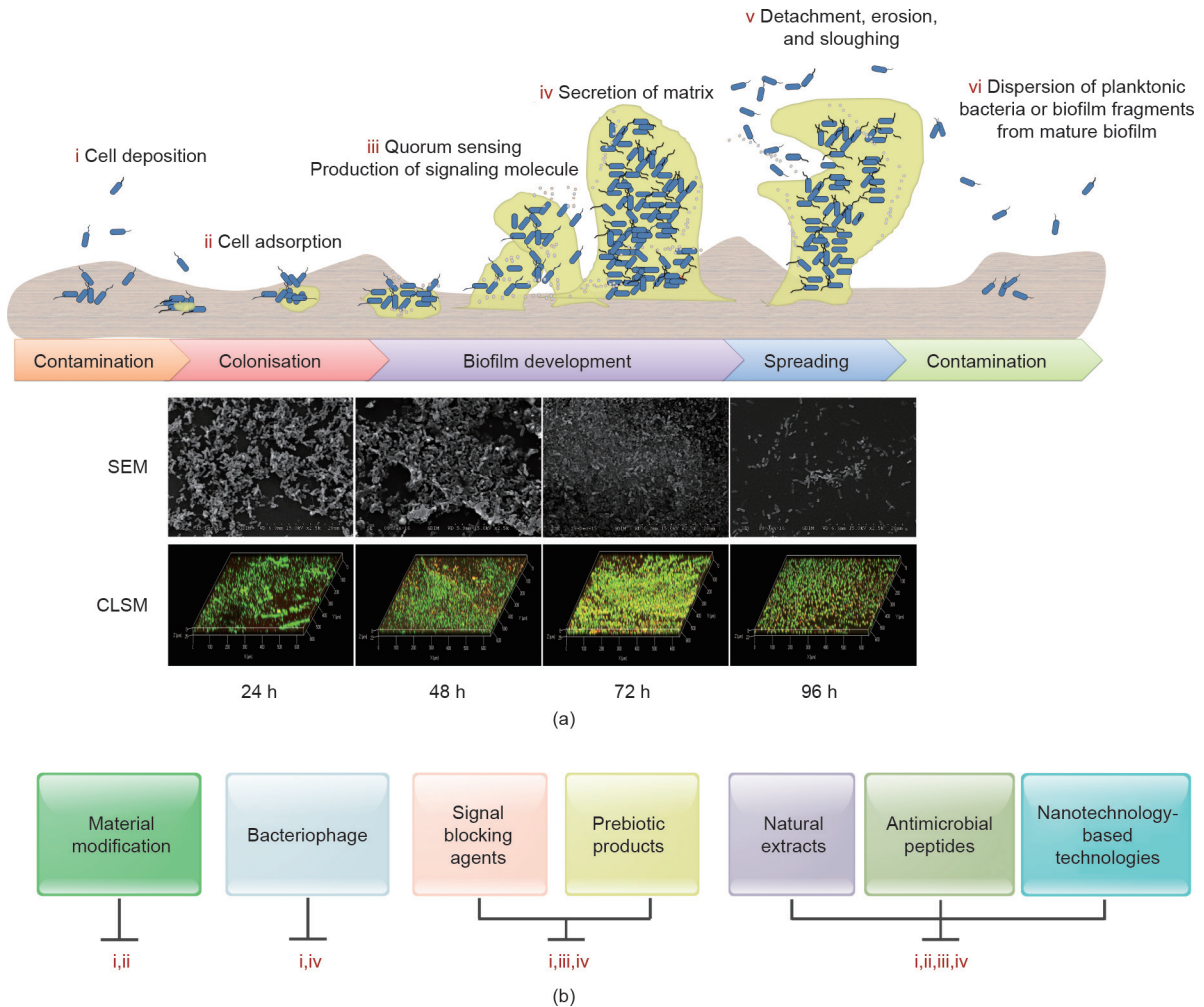


图1. 不同物质对生物膜形成的抑制作用。(a) 生物膜形成的动态过程, 包括附着、成熟、扩散和下一轮附着; 周期过程通常包括6个步骤, 如图所示。(b) 物质在生物膜形成的不同步骤中的去除作用, 如扫描电镜图像 ($\times 2500$) 所示。生物膜用碘化丙啶和SYTO9染色, CLSM观察。

Ye等[36]对23株 *C. sakazakii* 在不同孵育时间、pH值、温度条件下生物膜形成能力进行评估。结果表明, 生物膜形成过程中多糖的生物量和性质呈现菌株特异性, 并受其培养微环境的影响。在乳制品生产过程中, 生物膜的生长可能也与EPS和牛奶残渣 (主要是蛋白质和磷酸钙) 有关。牛奶成分也影响 *Cronobacter* 生物膜的形成。脱脂乳中乳清蛋白和酪蛋白比乳糖对 *Cronobacter* 生物膜形成的影响更大, 且氮源对其的影响大于碳水化合物[37]。此外, Ye等[38]还比较了 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 对从PIF分离的 *C. sakazakii* 生物膜的影响。结果显示, 二价阳离子浓度对生物膜总生物量有一定的影响, 1.50% MgCl_2 和 0.25% CaCl_2 为其最佳生长条件。并且, 二价阳离子还能改变细胞外基质的生物量特性。

2.1.1.2. 接触表面

接触面是生物膜形成的先决条件之一。接触表面的

性质将影响细胞黏附和随后生物膜的形成。当细胞接触和黏附介质时, 这两种物质之间可以建立静电相互作用。由于大多数细菌表面都带负电荷, 所以带正电荷的接触表面将有利于生物膜的形成[39]。然而, 在实际情况下, 接触面也可能暴露在由离子和小分子组成的高离子介质中, 这些离子和小分子通过扩散和传质过程吸附在接触面上, 从而改变接触面性质。接触面和细菌细胞之间的相互作用也随之被改变, 并建立起静电相互作用。当微生物细胞通过静电相互作用吸附到表面时, 细胞与接触面之间的距离缩短。

当接触面的非极性和低表面能疏水基团与细菌细胞相互作用后, 由于接触界面的疏水性有改变的趋势, 细胞在表面的黏附能力也受此改变[40,41]。Davidson和Lowe[42]发现接触表面的疏水基团有利于生物膜的形成和稳定。然而, Heistad等[43]却给出了不同的观点, 他认为界面疏水性与生物膜的形成没有明显的关系。研究

还发现,与不锈钢相比,*C. sakazakii*细胞更容易附着在硅胶和聚碳酸酯上($P<0.05$),且亲水性材料似乎更有利于*C. sakazakii*生物膜的形成[29]。因此,*C. sakazakii*生物膜形成与界面疏水性之间是否存在关联性是一个具有争议的问题,对该菌的黏附性仍需更多的研究去确证其相关性。

此外,表面粗糙度可降低液体流动相中细胞的水力剪切力。因此,表面粗糙度将保护细菌细胞不被水流清除,并增强细胞的初始黏附力。然而,不同细菌的细胞颗粒大小存在较大差异,从而会导致不同细菌的最佳接触表面粗糙度。

2.2. 细胞自我调节

2.2.1. 群体感应

在大多数环境中,生物膜以混合种群而非单一物种的形式存在。这种生存模式赋予其具有区别单一物种的特有生理功能。生物膜内物种的种间调节机制主要是群体感应(quorum sensing, QS)[44,45]。这种QS系统会产生一种称为“自诱导物”(autoinducer, AI)的低分子量信号分子,它根据周围环境中的细菌数量启动自身表达[46]。当生物膜中的细菌数量增长到一个感应阈值浓度时,细菌释放信号分子用以改变和协调其生理活动。QS系统监管细菌中营养物质的运输和代谢终产物的去除等相关基因表达的变化。这种调控行为可以降低由于细菌过度生长而导致的空间和营养的缺乏,从而促进生物膜的形成。

革兰氏阴性细菌主要利用*N*-酰基-*L*-高丝氨酸内酯(*N*-acyl-*L*-homoserine lactones, AHL)进行相互交流,而这些细菌传递信息的物质通常是几种AHL的混合物(图2)。群体感应通路通常包含两个重要的蛋白质(LuxI和LuxR),它们分别在自诱导物的合成和识别中起关键作用。LuxI是一种可以在细胞内外自由扩散,诱导合成QS自诱导物AHL及其衍生物的合成酶。随着细菌密度的增加,当AHL浓度达到临界值时,AHL与LuxR结合,并激活下游基因的表达,从而改变其对周围环境的生理反应[47]。AHL一般由一个含4~18个碳的乙酰基链尾部与一个保守的高丝氨酸内酯头部组成,其主要区别取决于酰基侧链的长度、饱和度及C3位的取代基[48]。目前,已有研究表明*C. sakazakii*可分泌3种信号分子(*N*-庚烷基-AHL、*N*-十二烷基-AHL和*N*-十四烷基-AHL)[49]。Lehner等[30]表示*Cronobacter*可通过表达群体感应信号分子AHL调控生物膜的形成,并用薄层色谱法发现

了两种不同类型的AHL——3-oxo-C6-AHL和3-oxo-C8-AHL。研究者采用高效液相色谱-串联质谱法联用技术检测AHL,结果表明C6~C18长链AHL的表达显著。此外,液相色谱-高分辨率质谱仪也在*C. sakazakii*成膜菌株中鉴定到*N*-十一烷基-*L*-AHL、*N*-十二烷基-*L*-AHL、*N*-十四烷基-*L*-AHL、*N*-十五烷基-*L*-AHL、*N*-(β -乙酰酮)-*L*-AHL、*N*-辛酰基-*L*-AHL、*N*-3-oxo-辛酰基-*L*-AHL和*N*-十八酰基-*L*-AHL的存在[50]。

未来更多的研究应该集中在QS系统介导的*C. sakazakii*生物膜形成和发展调控机制研究。这将为探索基于QS控制致病菌生物膜提供新策略。

2.2.2. 细胞的遗传元素和理化性质

生物膜中的微生物被其胞外高分子基质所包裹。胞外多聚物(extracellular polymeric substance, EPS)主要由细胞外多糖、蛋白质及细胞外DNA和基质组成,且该基质介导细胞在介质表面的黏附和细胞的集结(图3)。这些基质填充了细菌之间的空隙,构成良好的机械稳定性。由于这种结构稳定性,生物膜中的微生物获得很高的存活率和持久性。不同胞外聚合物组分的浓度、黏性、电荷和吸收能力,以及基质的密度、孔径和通道都决定了生物膜的异质性。因此,生物膜会呈现出各种形态学特征,如光滑、扁平、粗糙、蓬松或丝状,甚至形成像蘑菇状的水包围的团块[28]。

最近,研究人员通过比较蛋白组方法研究了*Cronobacter*的生物膜相和浮游相的差异蛋白,并证实了其差

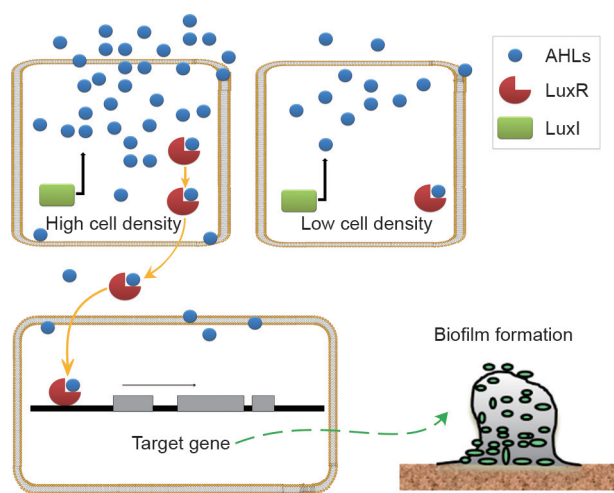


图2. 革兰氏阴性菌中AHL介导QS的简化图。革兰氏阴性菌具有两种调节成分: LuxI和LuxR。LuxI是AHL生物合成所必需的, LuxR编码AHL结合蛋白。一旦达到阈值浓度, AHL将自由进入邻近细胞。由LuxR和AHL组成的复合物将激活下游基因的表达。生物膜的形成随后受到AHL介导的QS调控的靶基因的影响。

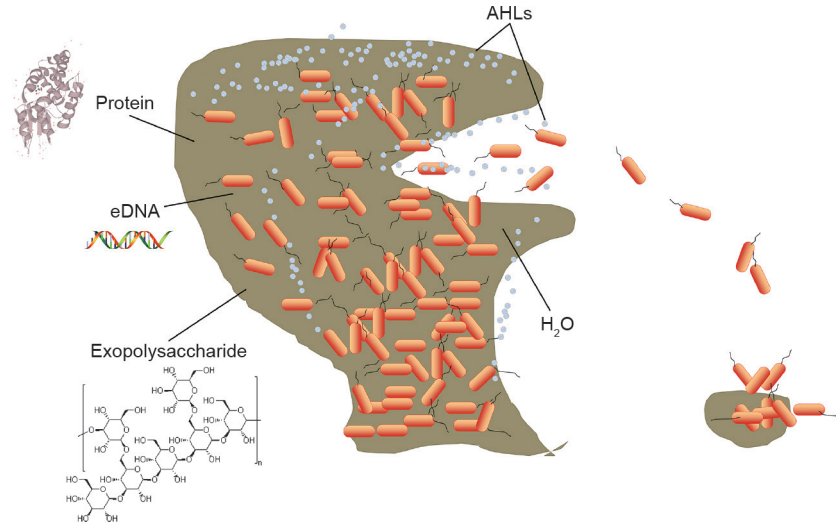


图3. 革兰氏阴性菌生物膜的基本成分。

异表达蛋白大多富集在鞭毛、纤维素合成、氨基酸代谢和碳水化合物的代谢途径中[51–53]。*Cronobacter* 荚膜由O抗原、K抗原、胆汁酸、纤维素和肠道菌共性抗原组成。这些组分的比例可能会随着生长条件的变化而变化，但目前还没有关于*Cronobacter* 荚膜的研究。有报道发现，特定的荚膜型别与新生儿脑膜炎病例有一定的关联性，因此这一领域需要被更多的关注[54]。此外，细菌产生的纤维素通常是细胞外的一种成分，它能给细胞提供机械和化学保护以抵御不利环境。纤维素也是生物膜的一个结构成分，它形成了具有强水吸附能力的水凝胶。纤维素是由BcsA和BcsB组成的纤维素合成酶复合物合成和分泌的。其中，*bcsA*编码纤维素合成酶催化亚单位，*bcsB*编码磷酸鸟苷环二聚体（cyclic dimeric guanosine monophosphate, c-di-GMP）结合蛋白。纤维素的生物合成和调控需要两个遗传元件，分别为*bcsABZC*和*bcsEFG*操作子（图4）。由9个基因（*bcsGFERQABZC*）组成的纤维素基因簇几乎在所有的*C. sakazakii*菌株中都存在[54]。Hu等[55]对临床、食品和环境分离出的菌株中纤维素合成酶相关基因的分布情况进行比较。结果表明，所有临床分离株中和大部分的食品、环境分离株可检出纤维素合成酶操纵子（*bcsABZC*）。此外，与亲代菌株相比，*bcsA*和*bcsB*的缺失会导致生物膜形成能力和细胞凝集力显著降低，并且*bcsA*和*bcsB*突变体不产生纤维素。BcsR对*C. sakazakii*纤维素合成有负调控作用，但对其生物膜形成、黏附和侵袭均有正调控作用。通过反转录聚合酶链反应（reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR）也验证了在 $\Delta bcsR$ 突变株中纤维素合成关键基因（*bcsA, B, C, E, Q*）比野生株表达

上调及鞭毛合成基因（*fliA, C, D*）、毒理基因（*ompA, ompX, hfq*）表达下调的现象。这些基因中， $\Delta bcsR$ 突变株中*fliC*和*ompA*表达量下调更显著。同时，研究者又通过拉曼光谱分析发现，在*bcsR*敲除后，类胡萝卜素、脂肪酸和酰胺等生物膜成分也显著降低[56]。

此外，细菌胞外细胞器（鞭毛、纤毛、菌毛等）有助于克服静电排斥并增强载体界面上的细菌积累[57]。通过对*Cronobacter*比较基因组分析，确定了10个假定的菌毛基因簇[58]。特别的是，编码 β -菌毛的基因簇是*C. sakazakii*特有的，而其他6个菌种的基因组编码卷曲菌毛。卷曲纤维是一种薄的、卷曲的、高度聚集的淀粉样纤维无定形的基质。它们参与了细胞褶皱、聚集、黏附、生物膜形成和环境滞留[59]。由于*C. sakazakii*感染途径可能是通过肠道细胞的附着和侵袭，所以该菌菌毛除了对生物膜的形成具有重要意义外，其在致病性方面也具有深远影响。Hartmann等[60]也同样发现，在其研究的*C. sakazakii*标准菌株和分离株中卷曲菌毛相关的基因也出现缺失现象。由于*C. sakazakii*是该属临床分离株的优势菌种，因此可以推断卷曲菌毛并非*Cronobacter*致病所必须的细胞器官。卷曲菌毛可与纤维素一起形成蜂窝状结构，促进生物膜的构建[61]。卷曲菌毛的生物合成和组装分别由两个转录操作子*csgDEFG*和*csgBA*编码。*csgBA*操作子编码卷曲结构主要的亚单位CsgA和细胞核蛋白CsgB [62]。Hu [63]在180株*C. sakazakii*中检测与此纤维素合成相关的遗传元件，结果发现，在所有的*C. sakazakii*菌株中均无*csgA*和*csgG*基因。此外，*csgBAC*和*csgDEFG*操作子在*C. sakazakii*菌株中也是缺失存在。尽管如此，*csgA*和*csgB*对除了*C. sakazakii*和*C. muytjen-*

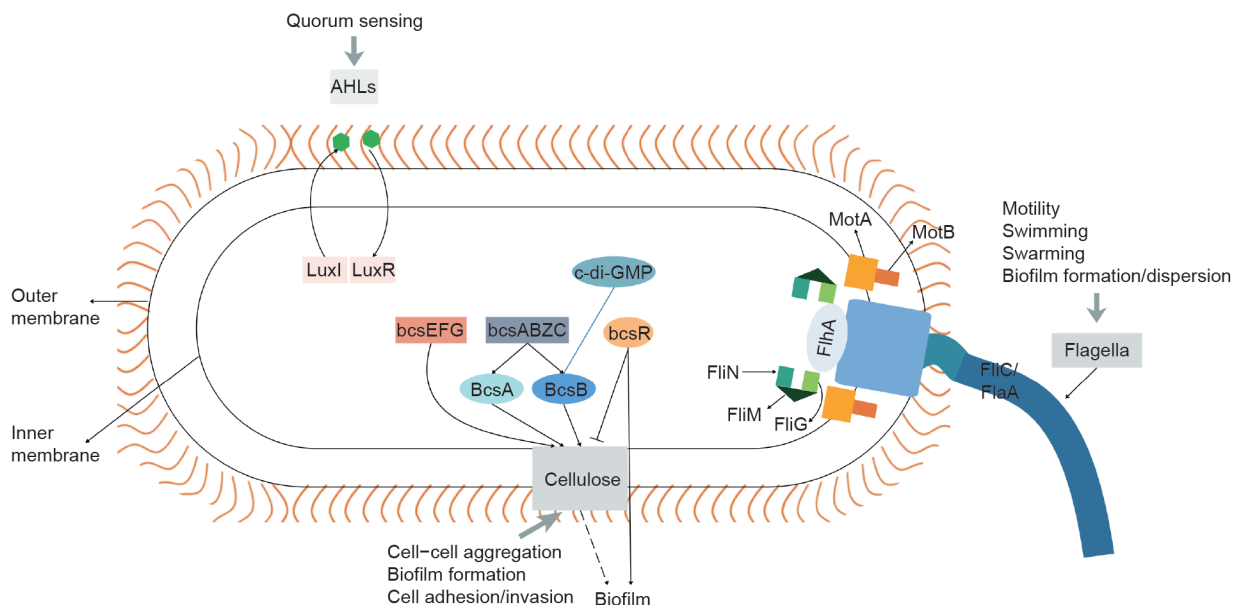


图4. 阪崎克罗诺杆菌生物膜形成调控网络[58-66]。

*sii*之外的*Cronobacter*其他菌种的卷曲菌毛、生物膜形成和细胞聚集都有积极的调控作用。因此, *C. sakazakii*可能通过表达其他途径中的不同蛋白质调控生物膜形成和细胞聚集, 使其产生与卷曲菌毛相似的生理功能。

运动性通常能赋予细胞具有从附着表面驶向更适合生长区域的能力, 而运动力往往被认为与生物膜的形成密切相关[64]。浮游态细胞因其有旋转鞭毛而具有运动性能(图4)。FliH和FliG蛋白构成了鞭毛基体, 而FliH的缺失会导致鞭毛成分的缺失。FliG与FliN和FliM一起构成基体的C环[65]。位于鞭毛基部的发动机(MotA和MotB蛋白)利用质子动力加强螺旋纤维的旋转以推动细胞至不同的环境[66]。 $\Delta fliH$ 、 $\Delta fliG$ 、 $\Delta fliC$ 和 $\Delta flaA\Delta fliC$ 突变株细胞无鞭毛并丧失自凝能力, 相反地, $\Delta motAB$ 和 $\Delta flaA$ 突变株仍保留鞭毛结构和自凝性。 $\Delta flaA$ 具有运动性, 而 $\Delta motAB$ 已不具有运动性。另外, FliC并非介导了*C. sakazakii*在PVC上的成膜性。研究人员认为, 运动性和基质合成通常是相反的, 且同步地被调控。然而, 通过对*C. sakazakii*鞭毛缺失突变体和一些调控基因的研究发现, 运动性与生物膜之间的关系是具有菌株特异性的。此外, 鞭毛是否对生物膜的形成有积极或消极作用的论题仍存在争议, 而非动力因素也可能影响生物膜的发育[67]。

近些年, 高通量的功能基因组学得到了长足发展, 微生物种群的研究范围大大提升。高分辨率的DNA测序技术对于探索不同环境的微生物群落组成和功能具有重要的价值[68]。代谢组学是一个不断发展的研究领

域, 它不仅可以发现生物标记还能够更好地揭示表型形成机制[69]。多组学数据技术(如转录组学、蛋白质组学和代谢组学)的联合应用可以系统性地捕捉微生物群落的结构、功能轮廓。由于信息学和分析技术的创新发展, “多组学”方法将为微生物生理学提供新的见解[70]。目前, 大型组学数据集的生物信息学分析可以应用于揭示与表型特征相关的调控途径及关键靶标。随后, 利用反向遗传学技术直接改变特定的DNA区域, 即可验证这些变化对生理现象的影响。因此, 这些技术将有助于加深理解细菌生物膜的形成机制, 包括它们的形成和分散过程(图5)。

3. 生物膜的清除与防控

*Cronobacter*可以从各种惰性和生物活性表面分离得到, 并在食品工业中广泛存在[24, 71-73]。据报道, 这种细菌可以从生产环境中检出, 且特定的菌株可以在工厂里存活几个月, 甚至几年。由于人们常用PIF和幼儿奶粉(follow-up-formula, FUF)喂养婴幼儿, 因此降低这些奶粉中的*Cronobacter*污染已成为人们关注的焦点[20]。一般情况下, PIF喂养不超过12个月大的婴儿; FUF是6个月以上的婴儿和12个月以上至3岁的幼儿的断奶食品[74,75]。这类产品在生产过程中会经过高温和干燥处理环节, 这些处理有助于保障产品的微生物安全[76,77]。然而, 在储存和包装的后处理过程中, 如滚筒干燥机、包装机、干燥塔和空气过滤器这些设备也会受

到*C. sakazakii*的污染(图6)。因此,在生产过程中细菌的生存将受到各种各样的挑战。生物膜的形成是细菌抵御外界应力的重要策略,生物膜对其的保护作用不容忽视。研究表明,生物膜态的*Cronobacter*细胞比浮游态细胞对清洁剂和消毒剂具有更高的耐药性,这就是个很好的证据[78]。目前,控制和消除乳制品/食品加工设备中的生物膜仍是一个挑战。

3.1. 原位清洗系统

在食品生产过程中,清洁是减轻微生物附着在接触面上的一个极其重要的过程。目前,原位清洗(clean in place, CIP)系统已逐步取代人工清洗。在此系统中,生产设备无需拆卸即可进行自动或半自动清洗,洗涤剂溶液通过压力或质量流量喷到设备上。这种方法现已被广泛应用于食品生产工厂的各个阶段[79]。

Bremer等[80]研究了CIP在乳品工业中去除不锈钢表面生物膜的效果。他们提出,标准CIP系统并非总能确保细菌生物膜的去除,而改变CIP条件可以增强乳品

加工厂内生物膜的去除。影响CIP清洁效果的因素有清洗温度、时间、化学成分、浓度、表面特性和生物膜层[81–83]。Kumari和Sarkar [84]在实验室模拟蜡样芽孢杆菌在乳制品冷藏槽中形成生物膜,以优化其CIP体系。标准CIP可达到每平方米3.29 log的减少量,而通过改变药剂浓度和CIP工艺处理时间得到优化后的CIP将达到每平方米4.77 log的清除量。优化CIP系统不仅可以提高食品安全,而且还可改善产品质量、设备性能,并具有良好的经济效益。然而,目前对于控制乳业中*C. sakazakii*生物膜的CIP优化体系还知之甚少。

3.2. 物理处理

通常,用于去除细菌生物膜的物理方法包括机械法、超声波法和电学法。设备的设计和表面材料的选择对防止生物膜的形成起着关键的作用。目前,铜合金广泛应用于食品加工工业中,其对细菌(尤其是抗铜离子的细菌)具有抑制作用[85]。铜合金可以从表面释放铜离子,改变细菌细胞膜的通透性,导致铜进入细胞,进

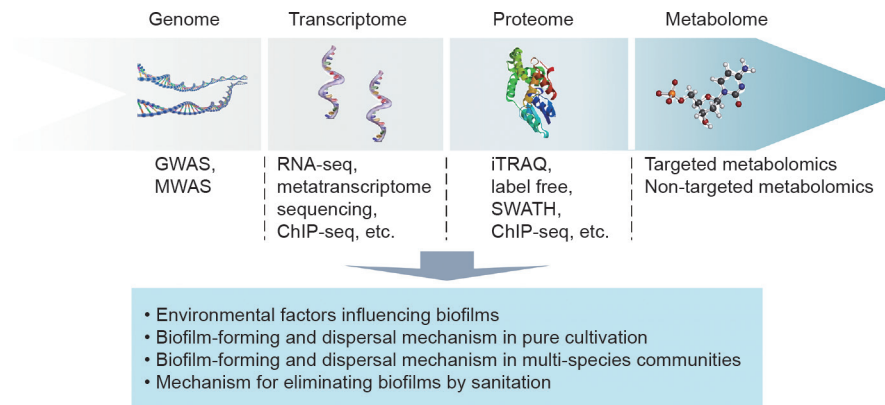


图5. 生物膜研究中的多种组学方法。GWAS: 全基因组关联分析; MWAS: 宏基因组关联性分析; RNA-seq: RNA测序(包括mRNA、小RNA、lncRNA和circRNA); ChIP-seq: 染色质免疫沉淀测序; iTRAQ: 同位素标记相对和绝对定量; SWATH: 按窗口顺序采集所有理论质谱谱图。

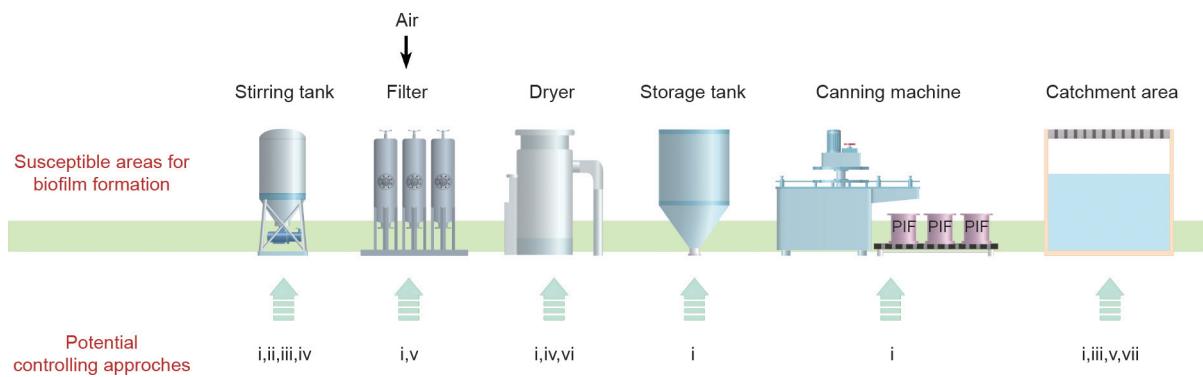


图6. 生物膜的常见定殖区和在PIF加工过程中潜在的生物膜处理方法。i. 涂层; ii. 益生元产品; iii. 噬菌体; iv. 天然提取物(包括基于天然提取物的信号阻断); v. 超声波清洗; vi. 基于纳米技术的递送系统; vii. 消毒剂。

而损伤铁硫蛋白[86]。Elguindi等[87]发现, 悬浮于胰酶大豆肉汤中的*C. sakazakii*细胞在湿的99.9%铜合金上会在10 min内被杀死, 且在干燥的99.9%铜合金上1 min内得以死亡。结果表明, 在食品加工干燥过程中应用铜可以有效地在包装前、包装中及包装后的储存中杀灭*C. sakazakii*。

*Cronobacter*对干燥具有高度耐受能力, 能在PIF中存活两年以上[88]。然而, 它不是产孢菌, 因此对热胁迫并未有较弱的抵抗力[89]。Nazarowec-White和Farber [90]测定了一个含有10株克罗诺杆菌(5株临床分离株和5株食品分离株)混池的*D*值。结果显示, 该混池52 °C、54 °C、56 °C、58 °C和60 °C的*D*值分别为54.8 min、23.7 min、10.3 min、4.2 min和2.5 min; *z*值为5.82 °C。此外, Iversen等[91]比较了*Cronobacter*标准菌株和荚膜菌株的耐热性。但由于结果的标准差较大, 所以标准菌株和荚膜菌株的*D*值和*z*值均无统计学差异。研究者还测定了54~62 °C下PIF中悬浮细胞的*D*值。54 °C时*D*值为10.2~16.4 min, 62 °C时*D*值为0.2~0.4 min; *z*值为5.7 °C。Awadallah等[92]发现, *Cronobacter*菌株具有耐热性, 在64 °C下该菌的*D*值为13.79 min; *z*值为14.42 °C。而Ueda [93]则发现, 60 °C以上*Cronobacter*菌株可在2~5 min内完全失活。因此, 联合国粮食及农业组织(The Food and Agriculture Organization, FAO)和世界卫生组织(World Health Organization, WHO)提出, PIF应在>70 °C的温度下冲泡, 并在残留菌株繁殖到显著水平之前立即使用[78]。然而, 在食品加工过程中, 热休克往往可能会诱导细菌的保护机制, 使机体能够在喷雾干燥处理后存活[94]。

CIP常采用的另一种消毒方法是电磁波辐射。电磁波法是通过破坏或改变生物大分子的结构来实现细菌失活的方法。Mahmoud [95]研究X射线照射*Cronobacter*后该菌的生存能力变化。结果表明, 5.0 kGy的X射线处理后, *Cronobacter*在脱脂牛奶和含有1%脂肪的奶粉中存活率均显著($P < 0.05$)降低至检测限以下($< 1 \log \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$)。此外, 紫外线(UV-C)(200~280 nm)、酸性电解水和中性电解水在微生物控制中应用也较多, 其中, UV-C光照对*C. sakazakii*的杀灭效果更好。使用 $7.5 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ 和 $10 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ 剂量的UV-C后, 活菌数分别减少 $2 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $2.4 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ [96]。近红外(near-infrared, NIR)加热与紫外辐射联合处理*C. sakazakii* 7 min后表现出较强的协同杀菌能力, 菌体CFU降低 2.79-log-unit , 这种协同作用主要破坏细菌细胞膜[97]。尽管在乳

制品工业中, 辐照是一种有效和安全的去除*C. sakazakii*的替代技术, 但维生素和脂类物质对辐照很敏感, 辐照可能会导致维生素和脂类的减少, 从而导致营养成分的损失。食物种类、辐照剂量、温度、含氧量、维生素种类等都会对辐照后的维生素损失产生不同程度的影响。从营养的最大化和食品安全与健康平衡的角度出发, 我们需要开发和改进更为先进的绿色杀菌技术。

与传统的擦拭方法相比, 超声是一种更有效的生物膜去除方法[98]。然而, 单独应用这项技术不能完全消灭细菌, 因此多种方法的联合使用应运而生。Adekunte等[99]对接种*C. sakazakii*的PIF在高温和超声协同作用下进行细菌灭活性比较, 结果表明, 两者联合使用可显著降低*C. sakazakii*的活性。压力超声波(manosonication, MS)是在压力下进行超声波, 其通过空化强度对细菌起到致死作用。*C. sakazakii*在标准处理下(35 °C, 117 μm , 200 kPa, 磷酸柠檬酸缓冲液pH 7.0)的*D*值是0.41 min, 这个结果高于小肠结肠炎耶尔森氏菌($D = 0.19 \text{ min}$), 并低于肠炎沙门氏菌($D = 0.61 \text{ min}$)、单核细胞增多性李斯特氏菌($D = 0.86 \text{ min}$)和屎肠球菌($D = 1.2 \text{ min}$) [100]。

物理处理无疑是主要的生物膜控制策略之一, 但它可能无法完全去除生物膜, 并且不适用于食品加工的所有阶段。因此, 需要化学或生物控制方法来补充或配合物理处理。

3.3. 化学处理

3.3.1. 杀菌剂

对高效、安全的抗菌物质的研发往往希望效益高、对环境无污染、无残留、经济效益高。Kim等[78]比较了13种消毒剂处理后, *Cronobacter*在悬浮液和不锈钢表面干燥的生物膜中的存活情况。这些消毒剂的选择参考其在医院、日托中心和食品服务厨房的使用情况。季铵盐类化合物和过氧乙酸/过氧化氢相关消毒剂对*Cronobacter*生物膜的杀灭效果较好。在浓度为 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的苯扎氯铵、过氧乙酸和二氧化氯15 min处理条件下, 活菌数分别减少了69%、73%和51%。然而, 使用结晶紫测定生物膜量时发现, 这些处理仅对18%的生物膜生物量产生抑制作用[101]。虽然这些杀菌剂在食品安全中发挥着重要作用, 但值得注意的是, 过量使用杀菌剂可能会产生耐药性菌株, 从而对临床重要药物产生交叉耐药[102]。目前, 细菌耐药性是一个全球共性问题, 它制约着临床治疗的有效性。

3.3.2. 植物提取物

传统的消毒方法对生物膜并非完全有效，反而可能会诱导抗性表型的改变。因此，有必要进一步开发和应用无化学残留的绿色（或生态友好型）杀菌剂。目前，很多研究正在评估从植物中提取的天然化合物在消除生物膜方面的潜力。这些天然化合物具有穿透细菌生物膜的能力，在环境中很容易降解，而且几乎无毒。

反式肉桂醛（trans-cinnamaldehyde, TC）是从肉桂皮提取的一种成分，也是肉桂油的原料，它是美国食品和药品监督管理局（Food and Drug Administration, FDA）批准的食品级物质。Amalaradjou和Venkitanarayanan [103]研究了TC对附着在聚苯乙烯板、不锈钢片、哺乳瓶片、肠内给料管片表面上的生物膜的抑制作用。结果发现，TC可以灭活附着在以上所有检测基质上的*C. sakazakii*生物膜。当*C. sakazakii*在 $38 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $750 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TC中处理96 h后，其存活量分别减少了超过 $4.0 \log \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $3.0 \log \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。此外，TC还能显著抑制*C. sakazakii*生物膜和毒力相关基因的表达，这些基因对其活力、宿主组织的黏附和侵袭、巨噬细胞的存活以及脂多糖的合成至关重要。因此，TC处理后，*C. sakazakii*对肠上皮细胞、脑微血管内皮细胞的黏附和侵袭受到明显抑制（ $P \leq 0.05$ ），并且其在人巨噬细胞中存活率也有所降低，并降低*C. sakazakii*自身的存活[104]。

多酚对人体健康非常有益，可以增强血管壁、促进胃肠消化、降低血脂、抑制细菌和癌细胞的增殖，并具有抗氧化活性可以清除对人体健康有害的自由基。近期，已证明圆叶葡萄种子提取物对*Cronobacter*具有一个高水平的杀灭能力，其在1 h可将大约 $6 \log \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的原始菌量降低到无法检测的水平（最低检出限， $10 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ ）。极性酚和多酚可能为圆叶葡萄种子提取物的主要抗菌成分[105]。蓝莓汁和蓝莓多酚也可抑制*C. sakazakii*。分别用蓝莓汁（pH 2.8）或蓝莓原花青素处理*C. sakazakii* 1 h，菌量从大约 $8.30 \log \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 降至无法检测的水平[106]。

3.3.3. 抗菌肽

抗菌肽（antimicrobial peptide, AMP）是一种天然免疫系统分子，并作为抵抗病原体入侵的第一道防线。这些天然蛋白广泛存在于包括动物、植物、昆虫和细菌的各种生物体中[107]。天然AMP通常比较短，由12~100个氨基酸组成。AMP基于其二级结构可以分为4种类型： β 折叠、 α 螺旋、环状和伸展性肽，其中前两类是

自然界中最常见的[108]。化学防腐剂的过度使用导致细菌产生耐药性，而传统的食品保鲜方法已不能满足食品安全的要求。近年来，AMP作为天然生物防腐剂被应用于提高食品的货架期[109]。许多研究人员表示，AMP可对多种食源性致病菌均表现出抑制作用，且不改变其食物特性，并对人体无危害性[110]。在解决细菌生物膜引起的持续污染研究中，AMP被认为是传统抗生素的潜在替代品。AMP能在生物膜形成的不同形成阶段与其对抗[111]。细菌的清除是由于抗菌肽的渗透或其在细胞膜表面形成小孔来实现的[112]。此外，AMP还能抑制细胞壁、核酸和蛋白质的生物合成。人类抗菌肽LL-37能够破坏表皮葡萄球菌生物膜的发育。LL-37显著降低细菌对表面的附着，且该抗菌肽在不能杀死或抑制其浮游细菌生长的浓度下也能显著减少其生物膜量，说明肽对生物膜产生了直接作用[113]。除此之外，AMP还被认为促发细菌的运动，并下调生物膜发育相关基因的表达[114]。

许多天然、半合成和合成的AMP已被证明均对微生物生物膜具有抗性。生物膜有效AMP (biofilm-active AMP, BaAMP)是一个收集了针对微生物生物膜有作用的AMP数据库。该数据库中的AMP可为生物膜形成过程的干预提供参考。靶向*Cronobacter*生物膜的AMP的优化以及发掘和合成新的肽段是非常必要的。BaAMP可以通过<http://www.baamps.it>免费访问。AMP的设计方法有很多，但合成抗菌肽在食品中的应用必须注意该物质的食用安全性。

3.4. 生物过程

微生物多种种间相互作用和产生的代谢产物会干扰生物膜的形成和发育。下面讨论两种最常用的通过微生物-微生物相互作用来消灭细菌及其衍生物的方法。

3.4.1. 益生菌产品

克菲尔（kefir）是一种对*C. sakazakii*具有抗菌活性的益生菌乳制品[115]。从kefir中分离的乳酸菌上清液中发现，*Lactobacillus kefir* DH5和*L. kefirano*faciens DH101这两种菌株对*C. sakazakii* ATCC 29544的增殖有明显的抑制作用。*L. kefir* DH5可破坏*C. sakazakii*的细胞膜完整性，因此其对该菌具有较高的灭活性。Awaisheh等[116]研究了乳酸菌对不同*C. sakazakii*的抗菌活性，发现从健康婴儿中分离的益生乳酸菌所产生的细菌素可以抑制*C. sakazakii*。然而，这些细菌素由于其低耐热性

而不能用于工业生产中。因此,在PIF中添加益生菌产品不仅能促进婴幼儿的健康成长,还能抑预防*C. sakazakii*的潜在污染。

3.4.2. 噬菌体

利用噬菌体来控制生物膜是一种可行的、自然的、无害的、特异的方法[117]。例如, QS信号分子AI-2的加入可以诱导原噬菌体,并促进了粪肠杆菌生物膜中的细菌解散[118]。ListShield (Intralytix, Inc., USA)是于2006年由FDA批准的第一个用于食品安全的噬菌体产品,从而确认噬菌体可作为一种食品中的安全添加剂[119]。至此以后,越来越多的噬菌体产品被批准作为食品微生物控制剂。这些进展突出了噬菌体在控制食源性致病菌和腐败微生物方面的潜力。与传统抗生素治疗相比,噬菌体相关的控制方法具有以下优点。

(1) 安全性高: 特异性噬菌体不会感染哺乳动物细胞。

(2) 易获取: 噬菌体在环境中普遍存在,因此相对容易获取。

(3) 特异性强: 靶向致病菌的特异性噬菌体将不干扰人体其他正常菌群和食物基质固有菌群。

为了保证PIF的安全性,雀巢公司提出了一种无毒的溶菌噬菌体,以减少*Cronobacter*的污染[120]。Endersen等[121]的研究发现,其测试的噬菌体鸡尾酒的宿主范围相对较广,覆盖了研究中73% *C. sakazakii*菌株。噬菌体混合(3×10^8 CFU·mL⁻¹)可显著降低*C. sakazakii*存活率,使其从 $\leq 10^4$ CFU·mL⁻¹降至低于检测限(< 10 CFU·mL⁻¹)。当细菌在噬菌体鸡尾酒处理48 h后,其生物膜的形成也受到了抑制。由于噬菌体可在4~37 °C、pH值范围为6~8的条件下增殖,且所有噬菌体都不具有溶原性,因此这些噬菌体具有潜在治疗应用价值。这些研究均表明噬菌体在PIF中*C. sakazakii*污染的生物控制以及预防该菌生物膜形成方面的潜在应用。

3.5. 潜在方法

3.5.1. 纳米技术

近些年,纳米材料及其技术的快速发展为开发控制微生物生物膜的抗菌剂提供了新策略[122]。纳米银、二氧化钛、氧化铜等纳米材料都具有良好的抗菌活性[123,124]。这些纳米粒子具有高稳定性、杀菌剂耐受性、低毒、比表面积高等特性,这些特性赋予纳米粒子具有与细菌相互作用更有效的位点。这些材料作为设备涂层

可以有效地控制食品加工过程中细菌的生长。

基于纳米技术的传递系统也是增强材料抗生物膜活性的重要手段。针对生物膜的杀菌剂效果通常由于其无法很好地渗透进生物膜基质而受到限制。然而,基于纳米技术的药物传递系统可以使纳米颗粒和微生物膜相互作用,进而药物直接作用生物膜的复杂结构。目前,用于传递生物活性物质的纳米载体主要有脂质体(liposome, LIP)、微乳液、纳米乳液、环糊精、固体脂质纳米颗粒、聚合物纳米颗粒和金属纳米颗粒[125]。Robinson等[126]比较了带有阳离子和阴离子的LIP负载疏水性杀菌剂三氯生(triclosan, TCS)对杀菌效果的影响, TCS是一种高效的烯酰-ACP还原酶抑制剂。阴离子脂质体对*S. sanguis*纯菌生物膜有较强的传递杀菌物质的效果,且该脂质体-三氯生体系具有更高的杀菌效果。而阳离子脂质体-三氯生传递系统只能抑制*S. sanguis* C104生物膜的生长,对混合菌群的生物膜无明显抑制作用。这些发现证明了静电相互作用对抗菌剂传递的重要性。

纳米酶被定义为具有类酶活性的纳米材料,可以在生理条件下催化天然酶底物产生类似的反应动力学行为[127]。这些材料基于纳米酶中氧化酶和过氧化物酶的活性能够催化产生自由基,破坏细胞膜的完整性,降解核酸,使各种蛋白质失活,最终导致细菌死亡。此外,天然酶的天然催化活性很容易受到周围环境的影响或抑制且易被蛋白酶消化,而人工酶可以克服天然酶的缺点。Tao等[128]构建了具有过氧化物酶和氧化酶双重酶活性的介孔二氧化硅负载金纳米颗粒(mesoporous silica supported gold nanoparticle, MSN-AuNP)抗菌体系。MSN-AuNP引发的类过氧化物酶活性可以催化H₂O₂分解为·OH,且其类氧化酶活性可以生成ROS。MSN-AuNP具有显著的酶活性,对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均表现出良好的抗菌能力和生物膜清除能力。具有类过氧化物酶活性的铁磁性纳米粒子(Fe₃O₄, MNP)可以催化过氧化氢的降解,从而有效降解DNA、蛋白质和多糖等生物分子。此外,Fe₃O₄、MNP可以增强H₂O₂清除生物膜的作用。H₂O₂单独处理生物膜后,生物膜残留率为49%±7.37%,而MNP-H₂O₂处理后,生物膜残留达18%±6.17% [129]。这一差异表明MNP-H₂O₂比H₂O₂更能有效地降低细菌的活力。

3.5.2. 信号阻抑

群体感应是调节生物膜群落发展和稳态的机制之

一。因此，研究者开发群体感应抑制剂（quorum sensing inhibition, QSI）以干预群体感应的调控行为，如细胞黏附和细胞外聚合物的分泌。因此，群体感应疗法通常通过调节细菌间的交流使细胞丧失某些功能。QS的过程可以被不同的机制破坏：①抑制QS信号分子的合成；②降解QS信号分子；③降低QS信号分子的活性；④设计信号分子的类似物，从而竞争性地与受体蛋白结合[130]。在QS抑制方法中，降解信号分子和抑制AHL合成是目前比较具有潜力的生物膜控制方法。Singh等[131]研究了9种植物提取物(黑胡椒、肉桂、芫荽、孜然、大蒜、肉豆蔻、生姜、丁香和葫芦巴)对*C. sakazakii*菌株QS介导的生物膜的抑制作用。利用生物指示物青紫色素杆菌026和根癌土壤杆菌NTL4 (pZLR4)测定在9种植物提取物对QS产物的影响，研究表明100 ppm的胡椒和肉桂分别导致QS产量下降78%和68%。并且，这两种提取物对*C. sakazakii*生物膜的形成均表现出较高的抑制作用 (>50%)，而其他提取物对生物膜的抑制作用为中等 (25%~50%) 和较低 (<25%)。该研究重点研究了黑胡椒和肉桂的抗群体感应，以抑制*C. sakazakii*生物膜形成的潜在能力，为进一步探索新的生物活性分子奠定基础。当然，其他植物提取物对QS的破坏方面的研究也仍需加强探究。

4. 食品加工厂中 *Cronobacter* spp. 生物膜防控的建议

婴幼儿配方奶粉之所以受*Cronobacter* spp.污染，可能与其生产环境、原料和工厂人员的传播有关。其中，储存罐、设备和操作室通常是微生物最易储藏的场所(图6)。工厂内的“死角”(如裂缝、角落、接缝和垫)往往是生物膜在清洗后仍可残留的区域。除了生物膜易残留的设备外，过滤和集水区的气溶胶颗粒也会引起细菌的滞留，从而形成生物膜。鉴于不同器具的实际应用和操作需要(机器的大小、质地、功能等)，食品生产设施中的细菌不能仅仅用一种方法消灭，因此建议采用多种技术相结合用于杀菌。其中，材料表面改性是防止微生物黏附和随后生物膜形成的一种非常实用的方法。当解决食品环境中生物膜的生态复杂性时，这些策略可能会展现出进一步的潜力。因此，对生物膜形成机制的清晰认识，对于实现一种新颖、实用、经济和环境友好的策略以确保食品安全具有至关重要的作用。

5. 结论与展望

高通量DNA测序技术极大地促进了对生物膜形成的分子机制的全面了解。应用各种手段可以大大减少生物膜的形成。特别是，接触材料的改性可干扰生物膜形成的各个阶段，从而达到生物膜的预防和控制。在抗菌物质和材料联合作用方面，最受欢迎和最有效的策略是表面涂层法，这是一种可直接靶向生物膜污染位点的方法。此外，由于受损的QS系统会进一步影响细胞附着、微生物基质分泌以及对其感染和致病性的预防，因此QS信号阻断化合物也是很有前景的研究方向。

自20世纪80年代中期首次正式定义生物膜这个概念以来，我们对生物膜的探索有了长足的进步。然而，*Cronobacter* spp.生物膜形成的相关研究仍处于起步阶段，在未来的研究中可将生物化学、细胞、分子和遗传学等相结合探究克罗诺杆菌生物膜的分子机制和功能。以下科学问题可能需要进一步思考和探究。

(1) *C. sakazakii*菌毛合成特异分子的机制是什么？菌毛如何影响生物膜形成？

(2) *C. sakazakii*生物膜抵抗极端干燥环境的机制是什么？

(3) 干燥处理是否改变*C. sakazakii*生物膜的组成成分，从而使其具有强抗干燥能力，其他细菌是否有相同的作用机制？

(4) 研究表明，引发新生儿患脑膜炎的*C. sakazakii*致病菌株与K2:CA2型荚膜密切相关。该型别的荚膜成分是否有利于该菌在婴幼儿配方奶粉和胃中滞留？

(5) 在生物膜内*Cronobacter* spp.如何与其他物种进行交流？不同种类的细菌之间是否存在共用的群体感应机制？

致谢

我们非常感谢国家重点研发计划项目(2017YFC1601200)、广东省科技计划项目(2017A070702018)、广州市科技计划项目(201604020003)及广东省科学院实施创新驱动发展能力建设专项资金项目(2017GDAS-CX-0201)的支持。

Compliance with ethics guidelines

Na Ling, Stephen Forsythe, Qingping Wu, Yu Ding,

Jumei Zhang, and Haiyan Zeng declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. BMC Evol Biol 2007;7(1):64.
- [2] International Commission on Microbiological Specifications for Food. Microbiological testing in food safety management. Report. New York: Klwer Academic/Plenum; 2002.
- [3] Arseni A, Malamou-Ladas E, Koutsia C, Xanthou M, Trikkia E. Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. J Hosp Infect 1987;9(2):143–50.
- [4] Centers for Disease Control Prevention. *Cronobacter* species isolation in two infants—New Mexico, 2008. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009;58:1179–83.
- [5] Lai KK. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. Medicine 2001;80(2):113–22.
- [6] Ries M, Harms D, Scharf J. Multiple cerebral infarcts with resulting multicystic encephalomalacia in a premature infant with *Enterobacter sakazakii* meningitis. Klin Padiatr 1994;206(3):184–6.
- [7] Van Acker J, De Smet F, Muyldermans G, Bougateg A, Naessens A, Lauwers S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. J Clin Microbiol 2001;39(1):293–7.
- [8] Yong W, Guo B, Shi X, Cheng T, Chen M, Jiang X, et al. An investigation of an acute gastroenteritis outbreak: *Cronobacter sakazakii*, a potential cause of food-borne illness. Front Microbiol 2018;9:2549.
- [9] Patrick ME, Mahon BE, Greene SA, Rounds J, Cronquist A, Wymore K, et al. Incidence of *Cronobacter* spp. infections, United States, 2003–2009. Emerg Infect Dis 2014;20(9):1520–3.
- [10] Belal M, Al-Mariri A, Hallab L, Hamad I. Detection of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) from medicinal plants and spices in Syria. J Infect Dev Ctries 2013;7(2):82–9.
- [11] Fei P, Jiang Y, Gong S, Li R, Jiang Y, Yuan X, et al. Genotyping occurrence and antibiotic susceptibility of *Cronobacter* spp. in drinking water and food samples from Northeast, China. J Food Prot 2018;81(3):456–60.
- [12] Forsythe SJ. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. Matern Child Nutr 2005;1(1):44–50.
- [13] Ling N, Li C, Zhang J, Wu Q, Zeng H, He W, et al. Prevalence and molecular and antimicrobial characteristics of *Cronobacter* spp. isolated from raw vegetables in China. Front Microbiol 2018;9:1149.
- [14] Ueda S. Occurrence of *Cronobacter* spp. in dried foods, fresh vegetables and soil. Biocontrol Sci 2017;22(1):55–9.
- [15] Vasconcellos L, Carvalho CT, Tavares RO, De Mello Medeiros V, De Oliveira Rosas C, Silva JN, et al. Isolation, molecular and phenotypic characterization of *Cronobacter* spp. in ready-to-eat salads and foods from Japanese cuisine commercialized in Brazil. Food Res Int 2018;107:353–9.
- [16] Xu X, Wu Q, Zhang J, Ye Y, Yang X, Dong X. Occurrence and characterization of *Cronobacter* spp. in powdered formula from Chinese retail markets. Foodborne Pathog Dis 2014;11(4):307–12.
- [17] Ye Y, Li H, Wu Q, Chen M, Lu Y, Yan C. Isolation and phenotypic characterization of *Cronobacter* from dried edible macrofungi samples. J Food Sci 2014;79(7):M1382–6.
- [18] Hamilton JV, Lehane MJ, Braig HR. Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. Emerg Infect Dis 2003;9(10):1355–6.
- [19] Pava-Ripoll M, Pearson RE, Miller AK, Ziobro GC. Prevalence and relative risk of *Cronobacter* spp., *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* associated with the body surfaces and guts of individual filth flies. Appl Environ Microbiol 2012;78(22):7891–902.
- [20] Iversen C, Forsythe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends Food Sci Technol 2003;14(11):443–54.
- [21] Kandhai MC, Reij MW, Gorris LG, Guillaume-Gentil O, Van Schothorst M. Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. Lancet 2004;363(9402):39–40.
- [22] Killer J, Skřivanová E, Hocheil I, Marounek M. Multilocus sequence typing of *Cronobacter* strains isolated from retail foods and environmental samples. Foodborne Pathog Dis 2015;12(6):514–21.
- [23] Arts M. *Enterobacter sakazakii* in factories and households. Lancet 2004;364(9432):414–5.
- [24] Fang R, Wang Q, Yang B, Zhang J, Cao B, Geng W, et al. Prevalence and subtyping of *Cronobacter* species in goat milk powder factories in Shaanxi Province, China. J Dairy Sci 2015;98(11):7552–9.
- [25] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol 2004;2(2):95–108.
- [26] Prosser JJ, Bohannon BJM, Curtis TP, Ellis RJ, Firestone MK, Freckleton RP, et al. The role of ecological theory in microbial ecology. Nat Rev Microbiol 2007;5(5):384–92.
- [27] Boles BR, Thoendel M, Singh PK. Self-generated diversity produces “insurance effects” in biofilm communities. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101(47):16630–5.
- [28] Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol 2010;8(9):623–33.
- [29] Iversen C, Lane M, Forsythe SJ. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. Lett Appl Microbiol 2004;38(5):378–82.
- [30] Lehner A, Riedel K, Eberl L, Breeuwer P, Diep B, Stephan R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence. J Food Prot 2005;68(11):2287–94.
- [31] Beuchat LR, Kim H, Gurtler JB, Lin LC, Ryu JH, Richards GM. *Enterobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. Int J Food Microbiol 2009;136(2):204–13.
- [32] Hurrell E, Kucerova E, Loughlin M, Caubilla-Barron J, Forsythe SJ. Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella* serovars and other Enterobacteriaceae. Int J Food Microbiol 2009;136(2):227–31.
- [33] Kragh KN, Hutchison JB, Melaugh G, Rodesney C, Roberts AE, Irie Y, et al. Role of multicellular aggregates in biofilm formation. MBio 2016;7(2):e00237–316.
- [34] Ling N, Zhang J, Li C, Zeng H, He W, Ye Y, et al. The glutaredoxin gene, *grxB*, affects acid tolerance, surface hydrophobicity, auto-aggregation, and biofilm formation in *Cronobacter sakazakii*. Front Microbiol 2018;9:133.
- [35] Jung JH, Choi NY, Lee SY. Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions. Food Microbiol 2013;34(1):70–80.
- [36] Ye Y, Ling N, Jiao R, Wu Q, Han Y, Gao J. Effects of culture conditions on the biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* strains and distribution of genes involved in biofilm formation. Lebensm Wiss Technol 2015;62(1):1–6.
- [37] Dancer GI, Mah JH, Kang DH. Influences of milk components on biofilm formation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). Lett Appl Microbiol 2009;48(6):718–25.
- [38] Ye Y, Ling N, Jiao R, Wu Q, Han Y, Gao J. Effects of Ca²⁺ and Mg²⁺ on the biofilm formation of *Cronobacter sakazakii* strains from powdered infant formula. J Food Saf 2015;35(3):416–21.
- [39] Soni KA, Balasubramanian AK, Beskok A, Pillai SD. Zeta potential of selected bacteria in drinking water when dead, starved, or exposed to minimal and rich culture media. Curr Microbiol 2008;56(1):93–7.
- [40] Pringle JH, Fletcher M. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. Appl Environ Microbiol 1983;45(3):811–7.
- [41] Thomas WE, Nilsson LM, Forero M, Sokurenko EV, Vogel V. Shear-dependent, “stick-and-roll” adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. Mol Microbiol 2004;53(5):1545–57.
- [42] Davidson CAB, Lowe CR. Optimisation of polymeric surface pre-treatment to prevent bacterial biofilm formation for use in microfluidics. J Mol Recognit 2004;17(3):180–5.
- [43] Heistad A, Scott T, Skaarer AM, Seidu R, Hanssen JF, Stenström TA, et al. Virus removal by unsaturated wastewater filtration: effects of biofilm accumulation and hydrophobicity. Water Sci Technol 2009;60(2):399–407.
- [44] Nadell CD, Xavier JB, Levin SA, Foster KR. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. PLoS Biol 2008;6(1):e14.
- [45] Teschler JK, Zamorano-Sánchez D, Utada AS, Warner CJ, Wong GC, Linington RG, et al. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. Nat Rev Microbiol 2015;13(5):255–68.
- [46] Jayaraman A, Wood TK. Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. Annu Rev Biomed Eng 2008;10(1):145–67.
- [47] Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. Annu Rev Microbiol 1996;50(1):727–51.
- [48] Dickschat JS. Quorum sensing and bacterial biofilms. Nat Prod Rep 2010;27(3):343–69.
- [49] Da Silva Araújo FD, Esper LMR, Kuaye AY, Sircili MP, Marsaioli AJ. N-acylhomoserine lactones from *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) and their degradation by *Bacillus cereus* enzymes. J Agric Food Chem 2012;60(2):585–92.
- [50] Singh N, Patil A, Prabhune A, Raghav M, Goel G. Diverse profiles of N-acylhomoserine lactones in biofilm forming strains of *Cronobacter sakazakii*. Virulence 2017;8(3):275–81.
- [51] Du XJ, Wang F, Lu X, Rasco BA, Wang S. Biochemical and genetic characteristics of *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. Res Microbiol 2012;163(6–7):448–56.
- [52] Yang JL, He YP, Jiang J, Chen WY, Gao Q, Pan LW, et al. Comparative proteomic analysis by iTRAQ-2DLC-MS/MS provides insight into the key proteins involved in *Cronobacter* spp. biofilm formation. Food Control 2016;63:93–100.
- [53] Ye YW, Jiao R, Gao JN, Li H, Ling N, Wu QP, et al. Proteins involved in

- responses to biofilm and planktonic modes in *Cronobacter sakazakii*. *Lebensm Wiss Technol* 2016;65:1093–9.
- [54] Ogrodzki P, Forsythe S. Capsular profiling of the *Cronobacter* genus and the association of specific *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* capsule types with neonatal meningitis and necrotizing enterocolitis. *BMC Genomics* 2015;16(1):758.
- [55] Hu L, Grim CJ, Franco AA, Jarvis KG, Sathyamoorthy V, Kothary MH, et al. Analysis of the cellulose synthase operon genes, *bcsA*, *bcsB*, and *bcsC* in *Cronobacter* species: prevalence among species and their roles in biofilm formation and cell–cell aggregation. *Food Microbiol* 2015;52:97–105.
- [56] Gao JX, Li P, Du XJ, Han ZH, Xue R, Liang B, et al. A negative regulator of cellulose biosynthesis, *bcsR*, affects biofilm formation, and adhesion/invasion ability of *Cronobacter sakazakii*. *Front Microbiol* 2017;8:1839.
- [57] Bullitt E, Makowski L. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature* 1995;373(6510):164–7.
- [58] Joseph S, Desai P, Ji Y, Cummings CA, Shih R, Degoricija L, et al. Comparative analysis of genome sequences covering the seven *cronobacter* species. *PLoS ONE* 2012;7(11):e49455.
- [59] DeBenedictis EP, Liu J, Keten S. Adhesion mechanisms of curli subunit CsgA to abiotic surfaces. *Sci Adv* 2016;2(11):e1600998.
- [60] Hartmann I, Carranza P, Lehner A, Stephan R, Eberl L, Riedel K. Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(7):2251–61.
- [61] Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Hammar M, et al. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* 2002;295(5556):851–5.
- [62] Hammar M, Arnqvist A, Bian Z, Olsén A, Normark S. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and Congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 1995;18(4):661–70.
- [63] Hu L. Prevalence of curli genes among *Cronobacter* species and their roles in biofilm formation and cell–cell aggregation. *Int J Food Microbiol* 2018;265:65–73.
- [64] Lemon KP, Higgins DE, Kolter R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol* 2007;189(12):4418–24.
- [65] Zhao X, Norris SJ, Liu J. Molecular architecture of the bacterial flagellar motor in cells. *Biochemistry* 2014;53(27):4323–33.
- [66] Macnab RM. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 2003;57(1):77–100.
- [67] Hoefflinger JL, Miller MJ. *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 autoaggregation requires FlhC flagellation, not motility. *Front Microbiol* 2017;8:301.
- [68] Franzosa EA, Hsu T, Sirota-Madi A, Shafquat A, Abu-Ali G, Morgan XC, et al. Sequencing and beyond: integrating molecular “omics” for microbial community profiling. *Nat Rev Microbiol* 2015;13(6):360–72.
- [69] Pappenfort K, Förstner KU, Cong JP, Sharma CM, Bassler BL. Differential RNAseq of *Vibrio cholerae* identifies the VqmR small RNA as a regulator of biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(7):E766–75.
- [70] Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016;17(7):451–9.
- [71] Fei P, Man C, Lou B, Forsythe SJ, Chai Y, Li R, et al. Genotyping and source tracking of the *Cronobacter sakazakii* and *C. malonaticus* isolated from powdered infant formula and an infant formula production factory in China. *Appl Environ Microbiol* 2015;81(16):5430–9.
- [72] Jacobs C, Braun P, Hammer P. Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. *J Dairy Sci* 2011;94(8):3801–10.
- [73] Reich F, König R, Von Wiese W, Klein G. Prevalence of *Cronobacter* spp. in a powdered infant formula processing environment. *Int J Food Microbiol* 2010;140(2–3):214–7.
- [74] FAO. Code of hygienic practice for powdered formulae for infants and young children. Report. Geneva: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2008. Report No.: CAC/RCP 66–2008.
- [75] Cordier JL. Production of powdered infant formulae and microbiological control measures. In: Farber JM, Forsythe SJ, editors. Emerging issues in food safety: *Enterobacter sakazakii*. Washington, DC: ASM Press; 2007.
- [76] World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Geneva: World Health Organization; 2004.
- [77] Arku B, Fanning S, Jordan K. Heat adaptation and survival of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*). *Foodborne Pathog Dis* 2011;8(9): 975–81.
- [78] Kim H, Ryu JH, Beuchat LR. Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(4):1256–65.
- [79] Thomas A, Sathian CT. Cleaning-in-place (CIP) system in dairy plant—review. *J Environ Sci Toxicol Food Technol* 2014;8(6):41–4.
- [80] Bremer PJ, Fillery S, McQuillan AJ. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int J Food Microbiol* 2006;106(3):254–62.
- [81] Boulange-Petermann L, Jullien C, Dubois PE, Benezech T, Faillie C. Influence of surface chemistry on the hygienic status of industrial stainless steel. *Biofouling* 2004;20(1):25–33.
- [82] Lelievre C, Faillie C, Benezech T. Removal kinetics of *Bacillus cereus*, spores from stainless steel pipes under CIP procedure: influence of soiling and cleaning conditions. *J Food Process Eng* 2001;24(6):359–79.
- [83] Lelièvre C, Legentilhomme P, Gaucher C, Legrand J, Faillie C, Bénézech T. Cleaning in place: effect of local wall shear stress variation on bacterial removal from stainless steel equipment. *Chem Eng Sci* 2002;57(8):1287–97.
- [84] Kumari S, Sarkar PK. In vitro model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control* 2014;36(1):153–8.
- [85] Elgundi J, Moffitt S, Hasman H, Andrade C, Raghavan S, Rensing C. Metallic copper corrosion rates, moisture content, and growth medium influence survival of copper ion-resistant bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;89(6):1963–70.
- [86] Grass G, Rensing C, Solioz M. Metallic copper as an antimicrobial surface. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(5):1541–7.
- [87] Elgundi J, Alwathnani HA, Rensing C. Rapid inactivation of *Cronobacter sakazakii* on copper alloys following periods of desiccation stress. *World J Microbiol Biotechnol* 2012;28(4):1837–41.
- [88] Edelson-Mammel SG, Porteous MK, Buchanan RL. Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula. *J Food Prot* 2005;68(9):1900–2.
- [89] Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J Appl Microbiol* 2003;95(5):967–73.
- [90] Nazarowec-White M, Farber JM. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Lett Appl Microbiol* 1997;24(1):9–13.
- [91] Iversen C, Druggan P, Forsythe S. A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int J Food Microbiol* 2004;96(2):133–9.
- [92] Awadallah MAI, Ahmed HA, Merwad AMA, Abou Elez RMM, Saleh KMA. Molecular characterization of *Cronobacter sakazakii* in Egypt, survival and thermoresistance at different temperatures: a potential public health risk. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2018;18(2):101–7.
- [93] Ueda S. The effects of temperature on the growth and heat resistance of *Cronobacter* spp. *Biocontrol Sci* 2017;22(2):125–9.
- [94] Arku B, Mullane N, Fox EM, Fanning S, Jordan KN. *Enterobacter sakazakii* survives spray drying. *Int J Dairy Sci* 2008;61(1):102–8.
- [95] Mahmoud BS. Inactivation effect of X-ray treatments on *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in tryptic soy broth, skim milk, low-fat milk and whole-fat milk. *Lett Appl Microbiol* 2009;49(5):562–7.
- [96] Santo D, Graça A, Nunes C, Quintas C. Survival and growth of *Cronobacter sakazakii* on fresh-cut fruit and the effect of UV-C illumination and electrolyzed water in the reduction of its population. *Int J Food Microbiol* 2016;231:10–5.
- [97] Ha JW, Kang DH. Synergistic bactericidal effect of simultaneous near-infrared radiant heating and UV radiation against *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula. *Appl Environ Microbiol* 2014;80(6):1858–63.
- [98] Oulahal-Lagsir N, Martial-Gros A, Bonneau M, Blum LJ. Ultrasonic methodology coupled to ATP bioluminescence for the non-invasive detection of fouling in food processing equipment—validation and application to a dairy factory. *J Appl Microbiol* 2000;89(3):433–41.
- [99] Adekunte A, Valdramidis VP, Tiwari BK, Slone N, Cullen PJ, Donnell CP, et al. Resistance of *Cronobacter sakazakii* in reconstituted powdered infant formula during ultrasound at controlled temperatures: a quantitative approach on microbial responses. *Int J Food Microbiol* 2010;142(1–2):53–9.
- [100] Arroyo C, Cebrián G, Pagán R, Condón S. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by ultrasonic waves under pressure in buffer and foods. *Int J Food Microbiol* 2011;144(3):446–54.
- [101] Torlak E, Gokmen M, Aydemir S. Efficacy of disinfectants against *Cronobacter* biofilm on plastic surfaces. *Qual Assur Saf Crop* 2015;7(5):819–23.
- [102] Condell O, Iversen C, Cooney S, Power KA, Walsh C, Burgess C, et al. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control salmonella enterica, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(9): 3087–3097.
- [103] Amalaradjou MAR, Venkitanarayanan K. Effect of trans-cinnamaldehyde on inhibition and inactivation of *Cronobacter sakazakii* biofilm on abiotic surfaces. *J Food Prot* 2011;74(2):200–8.
- [104] Amalaradjou MA, Kim KS, Venkitanarayanan K. Sub-inhibitory concentrations of trans-cinnamaldehyde attenuate virulence in *Cronobacter sakazakii* in vitro. *Int J Mol Sci* 2014;15(5):8639–55.
- [105] Kim TJ, Silva JL, Weng WL, Chen WW, Corbitt M, Jung YS, et al. Inactivation of *Enterobacter sakazakii* by water-soluble muscadine seed extracts. *Int J Food Microbiol* 2009;129(3):295–9.
- [106] Joshi SS, Howell AB, D’Souza DH. *Cronobacter sakazakii* reduction by blueberry proanthocyanidins. *Food Microbiol* 2014;39:127–31.
- [107] Hancock REW, Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 2006;24(12):1551–7.
- [108] Melo MN, Ferre R, Castanho MARB. Antimicrobial peptides: linking partition, activity and high membrane-bound concentrations. *Nat Rev Microbiol* 2009;7(3):245–50.
- [109] Rai M, Pandit R, Gaikwad S, Kövics G. Antimicrobial peptides as natural biopreservative to enhance the shelf-life of food. *J Food Sci Technol* 2016;53(9):3381–94.
- [110] Upendra RS, Khandelwal P, Jana K, Ajay Kumar N, Gayathri Devi M, Stephaney ML. Bacteriocin production from indigenous strains of lactic acid bacteria isolated from selected fermented food sources. *Int J Pharma Res Health Sci* 2016;4(1):982–90.
- [111] Jorge P, Lourenço A, Pereira MO. New trends in peptide-based anti-biofilm strategies: a review of recent achievements and bioinformatic approaches. *Biofouling* 2012;28(10):1033–61.

- [112] Di Luca M, Maccari G, Nifosì R. Treatment of microbial biofilms in the postantibiotic era: prophylactic and therapeutic use of antimicrobial peptides and their design by bioinformatics tools. *Pathog Dis* 2014;70(3):257–70.
- [113] Hell Å, Giske CG, Nelson A, Römmling U, Marchini G. Human cathelicidin peptide LL37 inhibits both attachment capability and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Lett Appl Microbiol* 2010;50(2):211–5.
- [114] Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun* 2008;76(9):4176–82.
- [115] Kim DH, Jeong D, Song KY, Kang IB, Kim H, Seo KH. Culture supernatant produced by *Lactobacillus kefir* from kefir inhibits the growth of *Cronobacter sakazakii*. *J Dairy Res* 2018;85(1):98–103.
- [116] Awaisheh SS, Al-Nabulsi AA, Osaili TM, Ibrahim S, Holley R. Inhibition of *Cronobacter sakazakii* by heat labile bacteriocins produced by probiotic LAB isolated from healthy infants. *J Food Sci* 2013;78(9):M1416–20.
- [117] Kudva IT, Jelacic S, Tarr PI, Youderian P, Hovde CJ. Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific bacteriophages. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(9):3767–73.
- [118] Rossmann FS, Racek T, Wobser D, Puchalka J, Rabener EM, Reiger M, et al. Phage-mediated dispersal of biofilm and distribution of bacterial virulence genes is induced by quorum sensing. *PLoS Pathog* 2015;11(2):e1004653.
- [119] Bren L. Bacteria-eating virus approved as food additive. *FDA Consum* 2007;41(1):20–2.
- [120] Breeuwer P, Boissindelaporte C, Joosten H, Lardeau A. Isolated phages and their use as disinfectant in food or for sanitation of factory environment. Switzerland patent WO2005049813A1P. 2003 Nov 19.
- [121] Endersen L, Buttmer C, Nevin E, Coffey A, Neve H, Oliveira H, et al. Investigating the biocontrol and anti-biofilm potential of a three phage cocktail against *Cronobacter sakazakii* in different brands of infant formula. *Int J Food Microbiol* 2017;253:1–11.
- [122] Rizzello L, Cingolani R, Pompa PP. Nanotechnology tools for antibacterial materials. *Nanomedicine* 2013;8(5):807–21.
- [123] Besinis A, Hadi SD, Le HR, Tredwin C, Handy RD. Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings. *Nanotoxicology* 2017;11(3):327–38.
- [124] Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65(13–14): 1803–15.
- [125] Dos Santos Ramos MA, Da Silva PB, Spósito L, De Toledo LG, Bonifácio BV, Rodero CF, et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. *Int J Nanomed* 2018;13:1179–213.
- [126] Robinson AM, Bannister M, Creeth JE, Jones MN. The interaction of phospholipid liposomes with mixed bacterial biofilms and their use in the delivery of bactericide. *Colloid Surface A* 2001;186(1–2):43–53.
- [127] Wei H, Wang E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. *Chem Soc Rev* 2013;42(14):6060–93.
- [128] Tao Y, Ju E, Ren J, Qu X. Bifunctionalized mesoporous silica-supported gold nanoparticles: intrinsic oxidase and peroxidase catalytic activities for antibacterial applications. *Adv Mater* 2015;27(6):1097–104.
- [129] Gao L, Giglio KM, Nelson JL, Sondermann H, Travis AJ. Ferromagnetic nanoparticles with peroxidase-like activity enhance the cleavage of biological macromolecules for biofilm elimination. *Nanoscale* 2014;6(5):2588–93.
- [130] Amara N, Krom BP, Kaufmann GF, Meijler MM. Macromolecular inhibition of quorum sensing: enzymes, antibodies, and beyond. *Chem Rev* 2011;111(1):195–208.
- [131] Singh N, Patil A, Prabhune A, Goel G. Inhibition of quorum-sensing-mediated biofilm formation in *Cronobacter sakazakii* strains. *Microbiology* 2016;162(9):1708–14.