

综 述

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002296

热带假丝酵母菌生物膜形成机制及其抗性研究

闫亚芳¹, 林赋桂¹, 景双艳², 余 甜², 魏莲花³

(1. 宁夏医科大学临床医学院, 银川 750000; 2. 甘肃中医药大学临床医学院, 兰州 730000;

3. 甘肃省人民医院检验科, 兰州 730000)

【摘 要】热带假丝酵母菌已成为第 3 种最常见的真菌病原体, 其形成生物膜的能力被认为是最重要的毒力因子之一。热带假丝酵母菌的生物膜是住院患者发病率和死亡率较高的独立危险因素, 且与感染患者的不良预后有关。但是, 对热带假丝酵母菌生物膜的研究少且分散。为此, 本文将从环境因素、基因调控、抗性和抗性机制等多方面对热带假丝酵母菌生物膜进行系统全面的综述。

【关键词】热带假丝酵母菌; 生物膜; 调节因子; 抗性机制

【中图分类号】R379.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-01-15

Formation mechanism and resistance study of *Candida tropicalis* biofilmYan Yafang¹, Lin Fugui¹, Jing Shuangyan², Yu Tian², Wei Lianhua³

(1. Medical College of Ningxia Medical University; 2. Medical College of Gansu University of Chinese Medicine;

3. Clinical Laboratory, People's Hospital of Gansu)

【Abstract】*Candida tropicalis* has become the third most common fungal pathogen, and its ability to form biofilms is considered as one of the most important virulence factors. The biofilm of *Candida tropicalis* is an independent risk factor for high morbidity and mortality in inpatients, and is associated with poor prognosis in infected patients. However, studies on *Candida tropicalis* biofilms are rare and scattered. For this reason, this paper will provide a systematic and comprehensive review of *Candida tropicalis* in terms of environmental factors, gene regulation, resistance, and resistance mechanisms.

【Key words】*Candida tropicalis*; biofilm; regulatory factors; resistance mechanisms

生物膜是依附于某载体表面的由胞外多聚物和基质网包被的高度组织化、系统化的微生物膜性聚合物。真菌生物膜, 尤其是假丝酵母菌的生物膜, 是引起与医疗器械有关感染的原因之一。这种感染特别严重, 因为生物膜细胞对许多常见的抗真菌药物具有相对的抗药性。导致血流感染的热带假丝酵母菌中有 70%~90% 能形成生物膜, 远远高于其他假丝酵母菌形成生物膜的比例 (<25%)^[1]。热带假丝酵母菌的生物膜是住院患者发病率和死亡率较高的独立危险因素, 且与感染患者的不良预后有关^[2-3]。但是, 对热带假丝酵母菌生物膜的研究非常少且分散。为此, 本文将从环境因素、基因调控、抗性和抗性机制等多方面对热带假丝酵母菌生物膜进行系统全面的综述。

1 热带假丝酵母菌生物膜的形成

假丝酵母菌生物膜形成分 3 个阶段。首先, 假丝酵母菌附着在生物材料的表面; 其次, 假丝酵母菌繁殖酵母菌细胞, 开始菌丝的发育, 产生胞外多聚基质, 成为抗真菌扩散的屏障; 最后, 成熟的生物膜细胞被释放, 进入血液, 并在宿主体内器官和其他医疗设备上定植。热带假丝酵母菌生物膜基质主要由己糖胺(27.4%)、碳水化合物(3.3%, 包括 0.5% 的葡萄糖)、蛋白质(3.3%)、尿酸(1.6%)和磷(0.2%)组成^[4]。

热带假丝酵母菌被定义为高生物膜生产者。以往大多数研究认为白假丝酵母菌比非白假丝酵母菌(NCAC)黏附性强, 最容易产生生物膜, 热带假丝酵母菌次之^[5]。但最新一项大样本研究表明, 热带假丝酵母菌生物膜生产率最高^[6]。该研究根据生物膜形成的总生物量和代谢活性对 577 种真菌分离物形成生物膜的能力进行评估, 结果表明热带假丝酵母菌生物膜产率最高。同样的, Guembe M 等^[7]证明热带假丝酵母菌在假丝酵母菌属中生物膜生产率最高。热带假丝酵母菌被定义

作者简介: 闫亚芳, Email: yfyanyafang@163.com,

研究方向: 病原微生物耐药。

通信作者: 魏莲花, Email: weilianhua0199@sina.com。

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目(编号: 17JR5RA035)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190917.1141.056.html>
(2019-09-18)

为高生物膜生产者,这与其高代谢活性所致的较强的菌丝生长和产气能力有关^[9]。另外,热带假丝酵母菌显著的生物膜形成能力在生物和非生物表面相似,在动物和人类分离株之间也相似,且来自深部组织的标本生物膜生成量更多。

2 环境因素影响热带假丝酵母菌生物膜形成

防治假丝酵母菌难治性感染的重要一环是预防生物膜的形成,阻止或抑制假丝酵母菌的定植和入侵。生物膜的形成高度依赖外界条件,如生长介质、环境 pH 和植入装置的类型及位置等。热带假丝酵母菌在酵母氮碱培养基中浮游菌的生长量最大,在 RPMI1640 中黏附能力增强,生物膜生长旺盛。无论是单种菌还是共生菌(白念与热带),葡萄糖和蔗糖都不同程度地促进了热带假丝酵母菌生物膜的形成,而非营养性的甜味糖精却可抑制这种能力^[18-19]。Ferreira C 等^[10]研究中首次证实与酸性环境相比,在中性和碱性环境下热带假丝酵母菌形成生物膜的能力更强且更易入侵人类阴道上皮。Guembe M 等^[11]最新研究发现血液样本比呼吸道样本中分离的热带假丝酵母菌生物膜产量(biofilm production, BP)高(平均 BP 1.4 vs. 0.4, $P=0.002$),但与其他部位的差别无统计学意义。这些发现为防治生物膜提供了新的方向和理论基础。

3 热带假丝酵母菌生物膜形成的基因调控

生物膜的形成高度依赖外界条件,因此很难比较假丝酵母菌间遗传调控的改变,且目前仅白假丝酵母菌和光滑假丝酵母菌整个基因组已知,对热带假丝酵母菌生物膜基因调控知之甚少。

3.1 黏附阶段基因调控

酵母细胞黏附在生物或非生物表面并进行克隆是生物膜发育的第一步。热带假丝酵母菌黏附素参与生物膜的形成,且受基因的调控。由 ALS1-7 和 ALS9 这 8 种蛋白组成的凝集素样序列基因家族(agglutinin-like sequence, ALS)与白假丝酵母菌的黏附密切相关,其中 ALS1、ALS3 和 ALS5 参与白假丝酵母菌对各种生物底物的黏附^[12]。热带假丝酵母菌 ALS 家族研究较少,Butler G 等^[13]研究最早证实热带假丝酵母菌基因组中有 16 名 ALS 家族成员,但其是否参与生物膜的发育还需要进一步研究。最近的研究表明,ALST1 和 ALST2 高度参与热带假丝酵母菌生物膜的形成,而 ALST3 在生物膜中的表达与浮游细胞相似^[14]。热带假丝酵母菌 ALS 家族的命名也有不同标准:一些作者将其定义为 ALST 基因,另一些将其定义为 CTRG 基因。CTRG 基因与白念的各种 ALS 基因之间存在差异,有研究将白假丝酵母菌的 ALS 基因与热带假丝酵母菌的 CTRG 基因联系起来,结果表明,CTRG_02293(ALS1)和 CTRG_03786(ALS2)在热带假丝酵母菌生物膜中高度表达,CTRG_01028(ALS3)对生物膜的形成不是必需的,而 CTRG_03797(ALS5)在生物膜中表达下调^[15]。

菌丝胞壁蛋白基因 1(hyphal wall protein 1, HWP1)是一种真菌细胞壁甘露蛋白,促进假丝酵母菌细胞附着在宿主表

面,它也是第一个参与白假丝酵母菌生物膜形成的细胞表面蛋白^[15]。先前的研究认为 HWP1 仅存在于白假丝酵母菌中,Harun WH 等^[16]证实 HWP1 在热带假丝酵母菌的黏附和生物膜形成中呈阳性表达,参与黏附素与细胞壁葡聚糖共价连接的产生。HWP1 基因可作为鉴定非白假丝酵母菌以及临床常见假丝酵母菌属种系统发育分析的良好标记^[17]。

3.2 成熟阶段基因调控

假丝酵母菌细胞丝状生长与生物膜的形成直接相关,随着菌丝的发育,产生胞外多聚基质,生物膜趋于成熟。

增强菌丝生长基因 1(enhanced filamentous growth factor 1, *EFG1*)是生物膜形成所必需的转录因子,其参与调节细胞表面和菌丝形成。*EFG1* 作为白假丝酵母菌蛋白激酶 A (PKA)信号通路的直接作用靶点,通过上调 *ALS3* 控制生物膜的形成和黏附。*EFG1* 的缺失使白假丝酵母菌和近平滑假丝酵母菌的生物膜出现类似的减少,即使在诱导菌丝生长的条件下,*EFG1* 缺失株也不能形成菌丝^[12]。Mancera E 等^[18]证实了热带假丝酵母菌中 *EFG1* 基因的存在,该转录因子发挥与白假丝酵母菌中相似的作用,参与丝状结构和生物膜形成的调控,且 *EFG1* 上游的 *PKA* 可能在菌丝生长和黏附方面具有保守功能。最近 1 项关于 *PKA* 与热带假丝酵母菌毒力因子的研究中发现,*TPK2* 缺失株不能形成生物膜,且导致 *EFG1*、*ALS3*、*HWP1* 和 *BRG1* 低水平表达,证实了 *PKA* 通过调控下游与黏附和菌丝生长有关基因的表达,间接调控生物膜的形成^[17]。此外,在热带假丝酵母菌基因组中,还发现了 *EFG1* 的同源基因,但分布位置与其在白假丝酵母菌中完全不同^[18]。

WOR1 作为热带假丝酵母菌中白色不透明开关的主要转录调控因子而为人所知,随着研究的深入,*WOR1* 被认为是成熟生物膜细胞释放的负调节因子。Porman AM 等^[19]研究发现 *WOR1* 促进丝状生长,使生物膜形成显著增加,且这种调控独立于白色不透明开关的调控。因此 *WOR1* 也是热带假丝酵母菌丝状结构的关键调控因子,且这种调控可以从白色不透明开关的调控中分离出来。

3.3 分散阶段基因调控

UME6 和 *NRG1* 是直接参与热带假丝酵母菌形态转换的关键转录调控因子,与成熟生物膜的分散有关^[20]。*UME6* 是负责菌丝形态和延伸的正转录调节因子且诱导 *HGC1* 转录,其过度表达降低了成熟固着细胞的释放。*NRG1* 是负转录调节剂,抑制菌丝形成,其过度表达会促进成熟生物膜细胞的分散。

3.4 MLST 分型与生物膜

随着对分子生物学的认识,许多分子分型方法已被应用于测定热带假丝酵母菌的分子流行病学和耐药性,如多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)。MLST 是种群分析的有用工具,MLST 数据通过互联网中央数据库在全球实验室中具有可比性,它满足了日益增长的全球监视需求。热带假丝酵母菌的 MLST 系统由 6 个管家基因(*ICL1*、*MDR1*、*SAPT2*、*SAPT4*、*XYR1* 和 *ZWF1a*)组成。Yu SB 等^[21]的研究首次揭示了 MLST 类型与热带假丝酵母菌毒力因子活性之间有显著相关性。MLST 5 组和 6 组的热带假丝酵母菌

黏附力强且生物膜产量高,而 MLST 1 组的热带假丝酵母菌黏附力和生物膜形成能力低。

4 热带假丝酵母菌生物膜抗性及抗性机制

4.1 热带假丝酵母菌生物膜抗性

从临床角度看,假丝酵母菌生物膜最重要的特征是增强了对常规抗真菌药物的抗性。1995 年首次报道了白假丝酵母菌生物膜对抗真菌药物的敏感性降低。NCAC 物种的生物膜,如热带假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌及近平滑假丝酵母菌也显示出对抗真菌药物抗性增强的特点。传统的抗真菌药物如三唑类药物和脂质体多烯类药物已被证明对假丝酵母菌生物膜无效^[21]。Brlhante RSN 等^[23]最近的研究显示卡泊芬净和两性霉素 B 对成熟生物膜的抗菌效果明显优于唑类抗真菌药,最有效的药物为卡泊芬净,最小抑菌浓度为 0.062 5 $\mu\text{g/mL}$ 或以下。而 Jain N 等^[24]在 CAS>16 $\mu\text{g/mL}$ 时才观察到对生物膜的抑制作用,至少比 Brlhante 研究中的抑菌浓度高 256 倍。Marcos-Zambrano LJ 等^[25]最新研究表明另一种棘白菌素类药物——米卡芬净,比两性霉素 B 和脂质体两性霉素 B 对热带假丝酵母菌生物膜更有活性,进一步证明了棘白菌素类药物是抵抗热带假丝酵母菌生物膜最有效的抗真菌药物。Yu SB 等^[21]利用延时摄像技术表明脂质体两性霉素 B 对生长的菌丝和酵母菌具有杀菌活性,对生物膜具有较强抑菌活性尤其是发育阶段的生物膜可被完全抑制。但即使是高剂量的脂质体两性霉素 B 也无法在成熟阶段根除生物膜。对抗真菌药物普遍耐药且难以根除是热带假丝酵母菌生物膜抗性的显著特点。

4.2 热带假丝酵母菌生物膜抗性机制

研究者探讨了生物膜抗性产生的机制。他们认为抗真菌药物抗性是一种内在的生物膜特征,这种抗性不涉及基因突变,是转变生长方式时发生的表型变化之一^[26]。

外排泵活性与甾醇水平改变。外排泵活性的增加有赖于多药耐药基因 1 (multidrug resistance 1, *MDR1*) 的过表达,使生物膜在早期生长阶段形成耐药性,而它们在成熟生物膜中的抗性作用很小^[26]。成熟生物膜较少依赖麦角甾醇来维持膜的流动性,可能会限制麦角甾醇靶向药物如唑类和两性霉素 B 的功效。Fernandes T 等^[27]首次揭示热带假丝酵母菌 *ERG* 基因 (ETS-related gene, *ERG*) 中 *ERG1*、*ERG3*、*ERG6*、*ERG9* 和 *ERG11* 的过表达干扰麦角甾醇生物合成,是生物膜抗性的可能机制。尤其是定位于麦角甾醇生物合成级联中的 *ERG11* 基因,它编码唑类药物靶标,在抗唑类药物抗性机制中起关键作用。Bizerra FC 等^[28]研究结果显示热带假丝酵母菌生物膜中 *MDR1* 和 *ERG11* 表达增加,可能与其对氟康唑、两性霉素 B 抗性升高有关。各种抗性机制之间相互依赖,外排泵在早期运行,而甾醇水平的改变则在中期和成熟期产生阻力。

基质-抗真菌隔离机制。热带假丝酵母菌生物膜对抗真菌药物的敏感性低于白假丝酵母菌生物膜,即使是静态情况下也是如此。可能是热带假丝酵母菌合成了含有己糖胺的生物膜,导致抗真菌药物难以穿透^[9]。热带假丝酵母菌基质中的

β -1,3 葡聚糖整合氟康唑,增强生物膜抗性,而基质成分 β -1,3 葡聚糖的水解可降低这种抗性^[29]。这种基质-抗真菌隔离机制在假丝酵母菌属普遍存在,对不同抗真菌药物普遍适用。

在生物膜抗性机制的研究中发现了滞留菌,这是一种深入生物膜的细胞亚群,对高浓度的抗真菌剂具有高度抗性。滞留菌的代谢失活状态和对抗真菌药物的应激反应在抗性机制中起关键作用^[30]。Li P 等^[30]已证实热带假丝酵母菌标准菌株 ATCC 13803 和临床菌株 T1427 的生物膜中存在滞留菌,滞留率分别是 0.17%、0.07%。而先前的一项研究在热带假丝酵母菌临床株 AAHB 73 的生物膜中未观察到任何滞留菌^[31],因此热带假丝酵母菌滞留菌的产生可能对媒介、菌株或底物有依赖性。

热带假丝酵母菌生物膜抗性是一个复杂的多因素现象,涉及不同的分子机制,包括与常规的浮游抗真菌抗性相似的机制,例如增加的外排泵活性,以及生物膜特有的机制,如甾醇水平的改变、药物通过基质的渗透受限和生物膜内滞留菌的存在。其他与生物膜抗性相关的因素如高细胞密度、生长速率和群体感应等已在白假丝酵母菌中得到验证,其在热带假丝酵母菌生物膜抗性机制中的作用有待研究。

5 展望

目前新的抗真菌疗法和抗真菌活性物质是重要的研究方向。抗菌光动力学疗法 (antibacterial photodynamic therapy, APDT) 作为一种新兴疗法,光在氧气的存在下刺激或触发光敏物质的抗菌作用,提高其产生活性氧的能力,最终导致病原微生物的氧化应激。因此,寻找新的光敏剂成为研究的热点。Marioni J 等^[32-33]系列研究发现 AQS 浓度较高的灌木提取物 (苯提取物) 在辐照条件下对热带假丝酵母菌生物膜生长有明显抑制作用,并且进一步阐述了 AQS 抗生物膜活性的主要光敏机制是由 AQS 激发态的电子转移猝灭形成的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 介导的。氧化锌纳米粒子 (ZnO) 因其独特的紫外吸收、催化、半导体、磁性等特性,在医疗保健产品中得到了广泛的应用。ZnO 纳米粒子能有效抑制导管表面对氟康唑耐药的热带假丝酵母菌的黏附能力和生物膜的发育^[34]。热带假丝酵母菌作为一种高产膜菌,其生物膜形成与患者的发病、治疗和预后密切相关。而关于其形成、调控和抗性机制等有待深入研究,这对临床抗真菌治疗至关重要。

参考文献

- [1] Tumbarello M, Posteraro B, Trecarichi EM, et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(6): 1843-1850.
- [2] Mario T, Barbara F, Maria TE, et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33705
- [3] Kawai A, Yamagishi Y, Mikamo H. Time-lapse tracking of *Candi-*

- da tropicalis* biofilm formation and the antifungal efficacy of liposomal amphotericin B[J]. Jpn J Infect Dis, 2017, 70(5):559–564.
- [4] Al-Fattani MA. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance[J]. J Med Microbiol, 2006, 55(Pt8):999–1008.
- [5] Pannanusorn S, Fernandez V, RoMling U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection[J]. Mycoses, 2013, 56(3):264–272.
- [6] Marcos-Zambrano LJ, Escibano P, Bouza E, et al. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points[J]. Int J Med Microbiol, 2014, 304(8):1192–1198.
- [7] Guembe M, Cruces R, Peláez T, et al. Assessment of biofilm production in *Candida* isolates according to species and origin of infection[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2017, 35(1):37–40.
- [8] Weerasekera MM, Wijesinghe GK, Jayarathna TA, et al. Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development[J]. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 2016, 111(11):697–702.
- [9] Weerasekera M, Jayarathna T, Wijesinghe K, et al. The effect of nutritive and non-nutritive sweeteners on the growth, adhesion, and biofilm formation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*[J]. Medical Principles and Practice, 2017, 26(6):554–560.
- [10] Ferreira C, Gonçalves B, Vilas Boas D, et al. *Candida tropicalis* biofilm and human epithelium invasion is highly influenced by environmental pH[J]. Pathogens & Disease, 2016, 74(8):ftw101.
- [11] Guembe M, Cruces R, Peláez T, et al. Assessment of biofilm production in *Candida* isolates according to species and origin of infection[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2017, 35(1):37–40.
- [12] Araújo D, Henriques M, Silva S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes[J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(1):62–75.
- [13] Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes[J]. Nature, 2009, 459(7247):657–662.
- [14] Shuanbao Y, Wenge L, Xiaoshu L, et al. Distinct expression levels of ALS, LIP, and SAP genes in *Candida tropicalis* with diverse virulent activities[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7:1175.
- [15] Galán-Ladero MA, Blanco-Blanco MT, Fernández-Calderon MC, et al. *Candida tropicalis* biofilm formation and expression levels of the CTRG ALS-like genes in sessile cells[J]. Yeast, 2019, 36(2):107–115.
- [16] Harun WH, Jamil NA, Jamaludin NH, et al. Effect of piper betle and brucea javanica on the differential expression of hyphal wall protein (HWP1) in non-*Candida albicans* *Candida*(NCAC) species[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013:397268.
- [17] Lin CJ, Wu CY, Yu SJ, et al. Protein kinase A governs growth and virulence in *Candida tropicalis*[J]. Virulence, 2018, 9(1):331–347.
- [18] Mancera E, Porman AM, Cuomo CA, et al. Finding a missing gene: EFG1 regulates morphogenesis in *Candida tropicalis*[J]. G3(Bethesda), 2015, 5(5):849–856.
- [19] Porman AM, Hirakawa MP, Jones SK, et al. MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation[J]. PLoS Genetics, 2013, 9(3):e1003369.
- [20] Uppuluri P, Pierce CG, Thomas DP, et al. The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion[J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(10):1531–1537.
- [21] Yu SB, Li WG, Liu XS, et al. The activities of adhesion and biofilm formation by *Candida tropicalis* clinical isolates display significant correlation with its multilocus sequence typing[J]. Mycopathologia, 2017, 182(5–6):459–469.
- [22] Ghannoum M, Roilides E, Katragkou A, et al. The role of echinocandins in *Candida* biofilm-related vascular catheter infections; *in vitro* and *in vivo* model systems[J]. Clin Infect Dis, 2015, 61(S6):618–621.
- [23] Brilhante RSN, De Oliveira JS, Evangelista, AJJ, et al. *Candida tropicalis* from veterinary and human sources shows similar *in vitro* hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*[J]. Vet Microbiol, 2016, 192:213–219.
- [24] Jain N, Kohli R, Cook E, et al. Biofilm formation by and antifungal susceptibility of *Candida* isolates from urine[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(6):1697–1703.
- [25] Marcos-Zambrano LJ, Escibano P, Bouza E, et al. Comparison of the antifungal activity of micafungin and amphotericin B against *Candida tropicalis* biofilms[J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 71(9):2499–2501.
- [26] Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance[J]. Future Microbiol, 2013, 8(10):1325–1337.
- [27] Fernandes T, Silva S, Henriques M. Effect of voriconazole on *Candida tropicalis* biofilms: relation with ERG genes expression[J]. Mycopathologia, 2016, 181(9–10):643–651.
- [28] Bizerra FC, Nakamura CV, Poersch CD, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance[J]. FEMS Yeast Res, 2008, 8(3):442–450.
- [29] Mitchell KF, Taff HT, Cuevas MA, et al. Role of matrix β -1,3 glucan in antifungal resistance of non-*albicans* *Candida* biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(4):1918–1920.
- [30] Li P, Seneviratne CJ, Alpi E, et al. Delicate metabolic control and coordinated stress response critically determine antifungal tolerance of *Candida albicans* biofilm persists[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(10):6101–6112.
- [31] Al-Dhaheri RS, Douglas LJ. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(5):1884–1887.
- [32] Marioni J, Arce JE, Cabrera JL, et al. Reduction of *Candida tropicalis* biofilm by photoactivation of a *Heterophyllaea pustulata* extract[J]. Pharm Biol, 2016, 54(12):2791–2801.
- [33] Marioni J, Bresolí-Obach R, Agut M, et al. On the mechanism of *Candida tropicalis* biofilm reduction by the combined action of naturally-occurring anthraquinones and blue light[J]. PLoS One, 2017, 12(7):e0181517.
- [34] Jothiprakasham V, Sambantham M, Chinnathambi S, et al. *Candida tropicalis* biofilm inhibition by ZnO nanoparticles and EDTA[J]. Arch Oral Biol, 2017, 73:21–24.