

戊糖片球菌 YF-8 对温和气单胞菌毒力因子及生物膜的影响

吕欣然¹, 崔晓玲¹, 杜宏¹, 夏文敬¹, 白凤翎^{1*}, 励建荣^{1,2}, 王明丽³

(¹渤海大学食品科学与工程学院 生鲜农产品贮藏加工及安全控制技术国家地方联合工程研究中心

辽宁省高等学校生鲜食品产业技术研究院 辽宁锦州 121013

²大连工业大学海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 辽宁大连 116034

³蓬莱京鲁渔业有限公司 山东烟台 265600)

摘要 温和气单胞菌是水产品中常见的腐败菌,其致病机制与群体感应密切相关,寻找淬灭群体感应的活性物质可以有效控制其致病能力。本文选择对温和气单胞菌 *N*-酰基高丝氨酸内酯类信号分子具有降解活性的戊糖片球菌 YF-8,研究其对温和气单胞菌毒力因子、生物膜及群体感应调控基因的影响。结果表明:亚最小抑菌浓度的 YF-8 乙酸乙酯粗提物(2.0, 4.0 mg/mL 和 6.0 mg/mL)对温和气单胞菌蛋白酶、胞外多糖、嗜铁素、溶血性、泳动能力的抑制率分别为 9.6%~32.72%, 17.91%~58.09%, 19.04%~44.35%, 19.21%~51.49%, 51.61%~93.55%, 且呈质量浓度依赖性。此外,3 个亚最小抑菌浓度的 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜形成抑制率和清除率分别为 31.28%~66.64% 和 6.7%~29.88%, 结构上可使其厚度变薄,菌体稀疏、松散。6.0 mg/mL 的 YF-8 粗提物可使温和气单胞菌群体感应调控基因 *LuxI* 和 *LuxR* 的相对表达量分别下调 69.48% 和 80.76%。本研究为控制由温和气单胞菌导致的水产品腐败及病害提供了新的思路。

关键词 温和气单胞菌; 戊糖片球菌; 群体感应淬灭; 毒力因子; 生物膜

文章编号 1009-7848(2022)08-0022-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.08.003

群体感应(Quorum sensing, QS)是一种细胞间独特的通信方式,即微生物能够通过群体依赖的方式分泌化学自诱导剂来进行通信并调控其行为和活性。细菌在低浓度时开始分泌信号分子,当其积累到一定浓度后便与受体蛋白相结合,启动相关下游基因的表达。这个过程由 *N*-酰基高丝氨酸内酯类(*N*-Acylated homoserine lactones, AHLs)合成酶(*LuxI* 型家族蛋白)和 AHLs 受体(*LuxR* 型家族转录调节蛋白)调控^[1]。群体感应系统主要参与调控生物膜的形成,生物发光,色素和抗生素的产生以及毒力因子的形成等。

温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)的 QS 调控系统为 *LuxI/R* 型,产生的信号分子为 AHLs 类,主要包括 *N*-辛酰基-*L*-高丝氨酸内酯(*N*-Octanoyl-*L*-homoserine lactone, C₈-HSL)和 *N*-癸酰基-*L*-高丝氨酸内酯(*N*-Decanoyl-*L*-homoserine lac-

tone, C₁₀-HSL)等,其生物膜的形成以及胞外蛋白酶、胞外多糖、嗜铁素等致病因子的产生均与 QS 系统密切相关。寻找一种能够有效淬灭温和气单胞菌 QS 的活性物质,成为解决其致病能力的新途径。目前已经发现多种具有 AHLs 淬灭能力的细菌和真菌。Pattnaik 等^[2]研究发现,真菌大豆茎溃疡菌(*Diaporthe phaseolorum*)SSP12 的次生代谢产物在 750 μg/mL 的质量浓度下能够显著抑制铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)PAO1 由 *LasI/R* 系统介导的蛋白酶 *LasA*、弹性蛋白酶 *LasB*、几丁质酶、胞外多糖和鼠李糖脂及生物膜的形成。Torres 等^[3]研究发现,极地寡单胞菌(*Alteromonas stellipolaris*)PQQ-42 与弧菌体外共培养时,可有效减少弧菌 AHLs 的积累,降低其蛋白酶和几丁质酶的产生,并抑制其群集和泳动的能力。

乳酸菌因安全、绿色、高效的特点而被广泛应用于食品领域。研究表明,乳酸菌来源的苯乳酸、细菌素等代谢产物可通过抑制 AHLs 合成,竞争性抑制 AHLs 与受体蛋白结合,使 AHLs 失活等作用方式干扰细菌 QS 系统^[4]。课题组前期筛选获得 1 株对温和气单胞菌 AHLs 具有淬灭作用的戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)YF-8,其乙酸乙

收稿日期: 2021-06-18

基金项目: 辽宁省博士科研启动基金项目(2020-BS-236); 辽宁省食品安全重点实验室开放课题(LNKLFS202102)

作者简介: 吕欣然(1990—),女,博士,讲师

通信作者: 白凤翎 E-mail: baifengling@163.com

酯粗提物在 2.0, 4.0 mg/mL 和 6.0 mg/mL 3 个亚最小抑菌浓度 (Subminimal inhibitory concentration, sub-MIC) 下不影响温和气单胞菌的正常生长。

本文从细胞水平探究戊糖片球菌 YF-8 粗提物对温和气单胞菌蛋白酶、胞外多糖、嗜铁素、溶血性、运动能力等致病因子的影响。采用结晶紫染色法和扫描电镜技术分析 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜形成的抑制作用及对已有生物膜的清除作用。从分子水平研究 YF-8 粗提物对温和气单胞菌 QS 调控基因的影响, 以期控制由温和气单胞菌导致的水产品腐败及病害提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株及其来源 乳酸菌菌株: 戊糖片球菌 YF-8, 分离自辽宁朝阳泡菜; 目标菌株: 温和气单胞菌, 分离自腐败大菱鲆体表。

1.1.2 培养基和试剂 MRS 培养基、LB 培养基、平板计数 (PCA) 培养基、酪蛋白培养基、血琼脂基本培养基、无菌脱纤维羊血, 北京奥博星生物技术有限公司; 细菌总 RNA 快速抽提试剂盒、反转录试剂盒、qRT-PCR 引物, 上海生工生物工程有限公司; 2.5% 戊二醛, 北京索莱宝科技有限公司; 铬天青, 天津市科密欧化学试剂科技有限公司; 溴化十六烷基三甲铵, 天津市光复精细化工研究所; 无水乙醇, 山东普利化化工厂。

1.2 仪器与设备

LHG-3 超级洁净工作台, 青岛翌宏仪器有限公司; MHP-500HE 生化培养箱, 常州梅香仪器; TGL20M 高速冷冻离心机, 常州金坛良友仪器有限公司; Czone5F 全自动菌落计数器, 杭州迅数科技有限公司; ReadMax 1900Plus 酶标仪, 上海闪普生物科技有限公司; 752N 紫外-可见分光光度计, 鑫贝西科学仪器有限公司; DED-2M 显微镜, 康华瑞明科技有限公司; S-4800 扫描电镜, 日本日立公司; QuantGene 9600 实时荧光定量 PCR 分析仪, 杭州博日科技股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 YF-8 乙酸乙酯粗提物的制备 参照孙梦桐等^[9]的方法制备乳酸菌无细胞上清液, 将 100

mL 上清液倒入分液漏斗中, 加入 20 mL 乙酸乙酯充分混匀, 静置萃取 5 min, 待分层后收集乳化层, 重复此步骤 5 次。将萃取液于 50 °C 下真空旋转蒸发至无乙酸乙酯气味, 收集残留液, 真空冷冻干燥成粉末, 置于 -80 °C 冰箱备用。

1.3.2 YF-8 粗提物对温和气单胞菌蛋白酶的影响 采用琼脂平板扩散法检测蛋白酶活性。取 10 μL YF-8 粗提物分别添加到 1 mL 温和气单胞菌培养物中, 使粗提物终质量浓度为 2.0, 4.0 mg/mL 和 6.0 mg/mL, 于 30 °C 共培养 24 h 后, 将共培养物于 4 °C, 8 000 r/min 下离心 5 min, 收集上清液。同时以 MRS 肉汤组为对照组。

在摆有牛津杯的素琼脂平板中倒入酪蛋白培养基, 冷却后将牛津杯取出, 在孔内加入 180 μL 共培养物上清液, 30 °C 下培养 24 h, 使用菌落计数器测量水解圈的直径。YF-8 粗提物对温和气单胞菌蛋白酶的抑制率按式 (1) 计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{d_c - d_{\text{QSI}}}{d_c} \times 100 \quad (1)$$

式中, d_c ——对照组水解圈直径, mm; d_{QSI} ——YF-8 处理组水解圈直径, mm。

1.3.3 YF-8 粗提物对温和气单胞菌胞外多糖的影响 采用苯酚硫酸法测定胞外多糖的含量。按 1.3.2 节方法制备 YF-8 粗提物和温和气单胞菌的共培养物, 将其以 10 000 r/min 离心 15 min, 获得的沉淀重悬于 0.5 mL 0.85% 生理盐水中, 然后在相同条件下继续离心 30 min, 获得的上清液与冷乙醇 (100%) 以体积比 1:3 的比例混合, 4 °C 条件下过夜沉淀。将沉淀的胞外多糖加入到浓硫酸和冷酚的混合液中, 并在波长 490 nm 处测量溶液的吸光度值。胞外多糖的抑制率按式 (2) 计算:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{OD}_c - \text{OD}_{\text{QSI}}}{\text{OD}_c} \times 100 \quad (2)$$

式中, OD_c ——对照组 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 值; OD_{QSI} ——YF-8 处理组 $\text{OD}_{490\text{nm}}$ 值。

1.3.4 YF-8 粗提物对温和气单胞菌嗜铁素的影响 采用琼脂平板扩散法测定嗜铁素含量。按 1.3.2 节方法制备 YF-8 粗提物和温和气单胞菌的共培养物上清液, 依据李婷婷等^[6]的方法配制 CASAD 嗜铁素检测培养基, 将其倒入摆有牛津杯的素琼脂平板中, 冷却后将牛津杯取出, 在孔内加入 180 μL 共培养物, 30 °C 下培养 24 h, 使用菌落

计数仪测量黄色晕圈的直径。嗜铁素的抑制率按式(1)计算。

1.3.5 YF-8 粗提物对温和气单胞菌溶血性的影响 采用琼脂平板扩散法检测溶血性。按 1.3.2 节方法制备 YF-8 粗提物和温和气单胞菌的共培养物上清液,将含 5% 无菌除颤羊血的 LB 培养基倒入摆有牛津杯的素琼脂平板中,在孔内加入 180 μL 共培养物上,30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h,使用菌落计数仪测量溶血圈的直径。溶血性的抑制率按式(1)计算。

1.3.6 YF-8 粗提物对温和气单胞菌运动能力的影响 采用 Gutierrez-Pacheco 等^[7]的方法测定运动能力。取 1 mL YF-8 粗提物分别添加到群集培养基(0.5% NaCl、0.6% 琼脂、0.5% 葡萄糖和 1% 蛋白胨)和泳动培养基(0.5% NaCl、0.3% 琼脂和 1% 胰蛋白胨)中,使粗提物终质量浓度为 2.0、4.0 mg/mL 和 6.0 mg/mL,混匀后倒板,待其凝固后将 5 μL 温和气单胞菌的过夜培养物点样于平板的中央。于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,使用菌落计数仪测量温和气单胞菌迁移的直径,以 MRS 肉汤组为对照组。迁移抑制率按式(1)计算。

1.3.7 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜的抑制和清除定量分析

1.3.7.1 生物膜抑制 采用结晶紫染色法测定。将 YF-8 粗提物添加到含温和气单胞菌的 LB 肉汤中,使粗提物终质量浓度分别为 2.0、4.0 mg/mL 和 6.0 mg/mL,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,移除孔中的悬浮液,用 PBS(pH 7.2)冲洗孔 3~5 次,每个孔添加 100 μL 结晶紫(0.4%)染色 20 min,最后用无菌水缓慢冲洗至孔内无明显紫色。将 96 孔板置于干燥箱中干燥 10~15 min,在每个孔内加入 200 μL 95% 乙醇溶液,使用酶标仪测量波长 595 nm 处的 OD 值。

1.3.7.2 生物膜清除 在含有 200 μL LB 肉汤的 96 孔板中加入 2 μL 温和气单胞菌过夜培养物,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,吸出孔中的悬浮液用于浮游细胞的存活测定,用 PBS(pH 7.2)冲洗孔 3~5 次。向孔内添加 200 μL 含有 YF-8 粗提物的新鲜 LB 肉汤,使粗提物终质量浓度分别为 2.0、4.0 mg/mL 和 6.0 mg/mL,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h 后,使用结晶紫染色法定量分析。

1.3.7.3 对浮游细胞的影响 采用平板计数法检测浮游细胞的存活率。取 100 μL 生物膜清除中的悬浮液,8 000 r/min 离心 5 min,将沉淀用 0.85% 的生理盐水溶液重悬后 10 倍梯度稀释,选择合适的稀释度进行涂布,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h 后,测定浮游细胞存活数目。

1.3.8 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜结构的影响 在 24 孔板中放入预先制好的无菌载玻片(1 cm \times 1 cm),按 1.3.7.1 节或 1.3.7.2 节方法用 YF-8 粗提物抑制或清除温和气单胞菌生物膜。YF-8 粗提物处理完成后移除孔中悬浮液,用 PBS(pH 7.2)冲洗载玻片 3~5 次。

1.3.8.1 光学显微镜 添加 500 μL 结晶紫(0.4%)染色 20 min,用无菌水缓慢冲洗至载玻片上无明显紫色。置于干燥箱中干燥固定 10~15 min 后,通过油镜观察载玻片上生物膜结构。

1.3.8.2 扫描电镜 用 2.5% 的戊二醛溶液固定生物膜 12 h。用无菌水洗去残留的戊二醛,再用不同梯度(40%、70%、90%、100%)乙醇依次脱水处理各 15 min,真空干燥后喷金,扫描电镜观察。

1.3.9 YF-8 粗提物对温和气单胞菌 QS 调控基因的影响 将 YF-8 粗提物添加至温和气单胞菌的过夜培养物中,使粗提物终质量浓度为 6.0 mg/mL,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清,收集菌体,用 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2)洗涤菌体 3 次,收集菌体,采用 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA,按照反转录试剂盒将提取的总 RNA 反转录合成 cDNA。

利用定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 QS 调控基因 *LuxI/LuxR* 表达量的变化,引物序列如表 1 所示。反应体系(20 μL):包含 10 μL 2 \times SYBR Green PCR Master Mix,4 μL 超纯水,0.5 μL 上游引物,0.5 μL 下游引物,5 μL cDNA。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$,30 min;95 $^{\circ}\text{C}$,10 s;55 $^{\circ}\text{C}$,20 s;72 $^{\circ}\text{C}$,20 s;75 $^{\circ}\text{C}$ 停留 5 s 收集荧光信号,反应共进行 40 个循环^[8]。以温和气单胞菌 *16S rRNA* 为内参基因,基因表达差异依据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算。

1.4 数据处理与统计分析

每项试验重复 3 次,数据以平均值 \pm 标准差表示。采用 SPSS 19.0 进行数据分析,Origin 8.0 进行绘图。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Sequences of primers used for qRT-PCR

| 基因 | 序列方向 | 序列(5'→3') | 扩增长度/bp |
|-----------------|------|----------------------|---------|
| <i>16s rRNA</i> | 正向 | GACACAGCCTCCAAATCGAC | 101 |
| | 反向 | TGGACAAAGACTGACGCTCA | |
| <i>luxI</i> | 正向 | GCATCTTCCGCCGACTTG | 146 |
| | 反向 | ATAATGGCCCAGCAGAGGTT | |
| <i>luxR</i> | 正向 | AGCAATCTGGGGAAGTTGGT | 109 |
| | 反向 | GCAAAACCGGCTCAATGAAC | |

2 结果与讨论

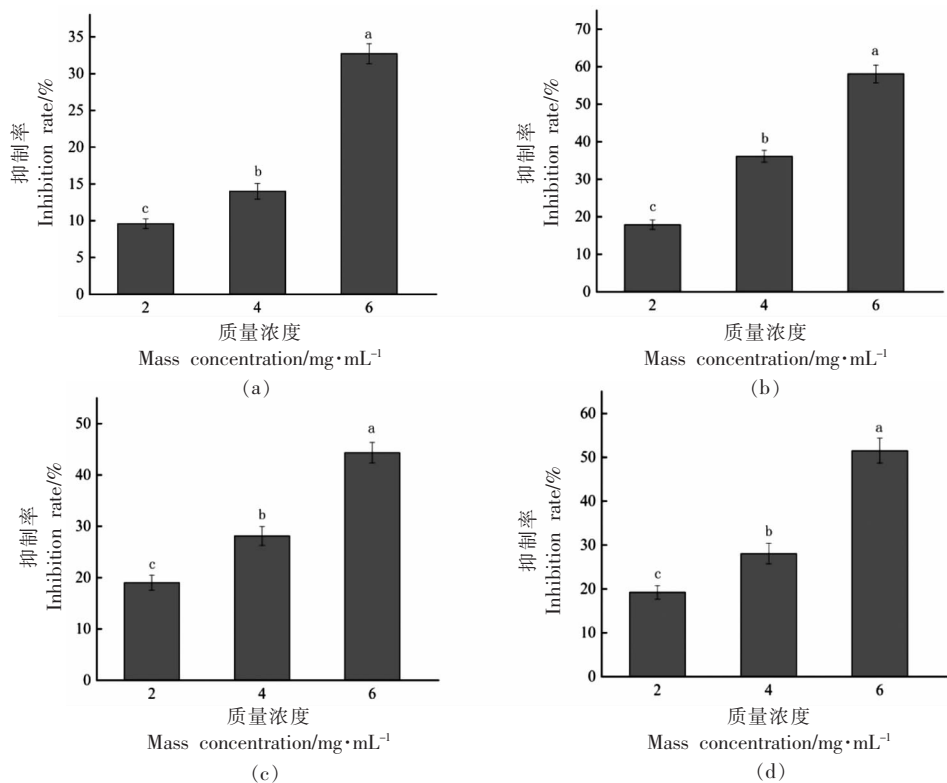
2.1 YF-8 粗提物对温和气单胞菌蛋白酶的影响

温和气单胞菌可以产生丰富的胞外蛋白酶, 这些蛋白酶水解能力很强, 能够使水产品中的蛋白质分解, 从而促进其自身的生长繁殖, 并导致水产品腐败^[9]。3 个 sub-MICs 的 YF-8 粗提物对温和气单胞菌蛋白酶的影响如图 1a 所示。从图中可以看出, 随着 YF-8 粗提物质量浓度的升高, 其对温和气单胞菌蛋白酶的抑制作用也随之增强, 且具有质量浓度依赖性。当 YF-8 粗提物质量浓度为

6.0 mg/mL 时, 抑制作用最强, 抑制率为 32.72%。表明 YF-8 粗提物在 3 个 sub-MICs 下对温和气单胞菌蛋白酶有较强的抑制作用。

2.2 YF-8 粗提物对温和气单胞菌胞外多糖的影响

胞外多糖在黏附宿主的过程中起着重要的作用, 有利于腐败菌或致病菌生物膜的形成及发育^[10]。抑制细菌胞外多糖的分泌可以一定程度上降低细菌对宿主的伤害。从图 1b 中可以看出, 温和气单胞菌的胞外多糖分泌会受到 YF-8 粗提物



注: 不同小写字母表示不同质量浓度 YF-8 粗提物处理具有显著性差异 ($P < 0.05$), 下同。

图 1 YF-8 粗提物对温和气单胞菌蛋白酶(a)、胞外多糖(b)、嗜铁素(c)和溶血性(d)的影响

Fig.1 Effects of YF-8 crude extract on protease (a), extracellular polysaccharide (b), siderophore (c) and hemolysis (d) of *A. sobria*

的干扰,且质量浓度越高,干扰作用越强。当粗提物质量浓度为 6.0 mg/mL 时,其胞外多糖的分泌量比对照组降低了 58.09%,干扰作用最强,表明 YF-8 粗提物可以抑制温和气单胞菌胞外多糖的分泌。Ding 等^[11]研究发现,当用苯甲醇处理荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)时,其分泌的胞外聚合物在种类和数量上都显著减少,且具有质量浓度依赖性,与本研究结果一致。

2.3 YF-8 粗提物对温和气单胞菌嗜铁素的影响

嗜铁素是指细菌、真菌等微生物在铁含量较低的环境中合成的相对分子质量较小(1~2 ku)的次级代谢产物^[12],能特异性地螯合 Fe^{3+} 。温和气单胞菌可以在生存环境中分泌大量嗜铁素,使其它微生物无法获得足够的铁营养,生长繁殖受抑制,从而保持其自身的菌群密度,导致水产品腐败变质。从图 1c 中可以看出,3 个 sub-MICs 的 YF-8 粗提物对温和气单胞菌嗜铁素的抑制率分别为 19.04%,28.12%和 44.35%,表明温和气单胞菌嗜铁素的产生受到 YF-8 粗提物的抑制,且具有剂量依赖性。

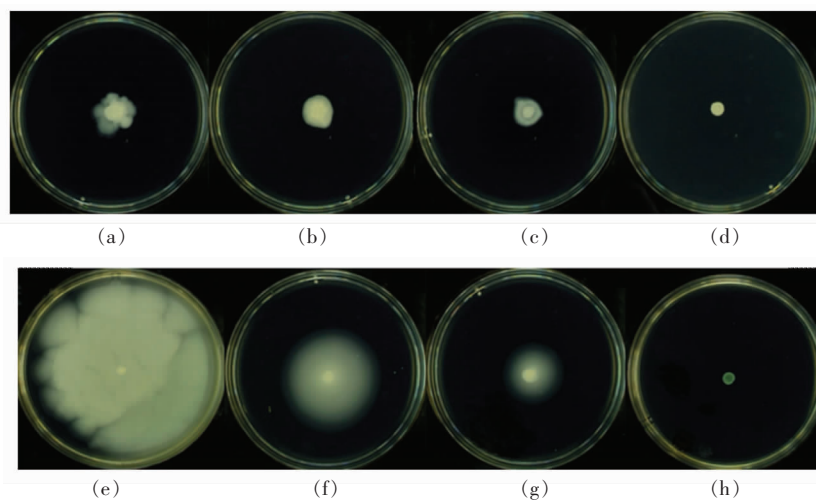
2.4 YF-8 粗提物对温和气单胞菌溶血性的影响

溶血性被认为是温和气单胞菌能够引发水产品病害的潜在原因之一,因此其常被作为研究温和气单胞菌潜在致病性的重要指标^[13]。从图 1d 中可以看出,温和气单胞菌的溶血活性随着 YF-8 粗提物质量浓度的升高而降低,当粗提物质量浓

度为 6.0 mg/mL 时溶血活性最低。表明 YF-8 粗提物对温和气单胞菌溶血活性的抑制作用具有质量浓度依赖性。Kannan 等^[14]研究发现,750 μ g/mL 迷迭香酸显著抑制嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)溶血素的产生,抑制率可以达到 89%,这与本研究结果一致。

2.5 YF-8 粗提物对温和气单胞菌运动能力的影响

细菌的群集和泳动是鞭毛介导的两种迁移形式,与致病菌的致病性及生物膜形成有着密切的关系^[15]。抑制温和气单胞菌群集和泳动的能力对防治其引起的水产品腐败和病害有着非常重要的作用。YF-8 粗提物对温和气单胞菌运动能力的影响如图 2 所示。由图 2 可知,经 YF-8 粗提物处理后,温和气单胞菌迁移的距离明显缩短。2.0,4.0 mg/mL 和 6.0 mg/mL 的 YF-8 粗提物对温和气单胞菌群集和泳动的抑制率范围为 21.05%~65.79% 和 51.61%~93.55%。当粗提物质量浓度为 6.0 mg/mL 时,温和气单胞菌的群集和泳动能力几乎完全被抑制,表明 YF-8 粗提物可以很好地抑制温和气单胞菌的运动能力,且这种抑制作用呈质量浓度依赖性,这可能是由于温和气单胞菌鞭毛的黏附能力受到了抑制,进而影响了其运动能力。Ding 等^[9]研究发现,sub-MIC 的姜黄素脂质体对温和气单胞菌的胞外蛋白酶活性、嗜铁素分泌能力以及群集泳动能力等均有一定的抑制作用,与本试验



注:(a)~(d):群集,(e)~(h):泳动,从左到右依次为 0,2.0,4.0,6.0 mg/mL YF-8 粗提物处理结果。

图 2 YF-8 粗提物对温和气单胞菌群集和泳动的影响

Fig.2 Effects of YF-8 crude extract on swarming and swimming in *A. sobria*

结果类似。

2.6 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜抑制和清除的定量分析

生物膜是细胞通过附着在物体表面的胞外聚合物结合在一起而形成的稳定的多细胞簇。其可以保护细菌免受抗菌剂的作用,比浮游细胞具有更强的抵抗外界变化的能力。AHLs 介导的 QS 系统对温和气单胞菌生物膜的形成、附着及固定起

着关键性作用^[16]。

2.6.1 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜形成的抑制 从图 3a 中可以看出,3 个 sub-MICs 下 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜形成的抑制率在 31.28%~66.64% 范围内,随着 YF-8 粗提物质量浓度的增加,温和气单胞菌生物膜的形成量逐渐降低,抑制作用呈质量浓度依赖性。

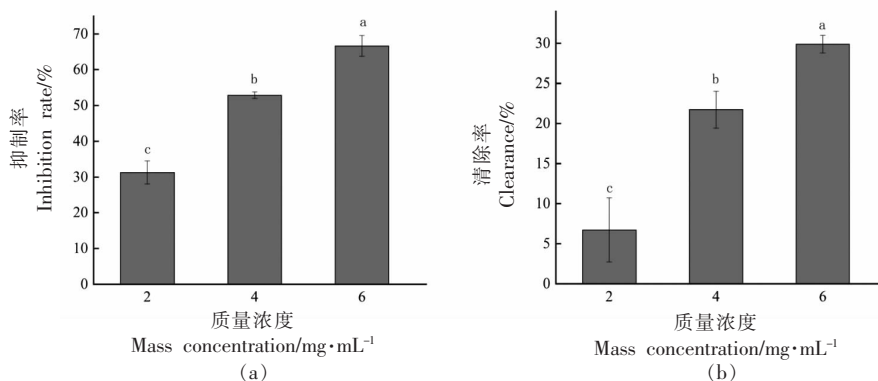


图3 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜抑制(a)和清除(b)的定量测定

Fig.3 Quantitative determination of YF-8 crude extract on the inhibition (a) and clearance (b) of *A. sobria* biofilm

2.6.2 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜的清除作用 从图 3b 中可以看出,3 个 sub-MICs 下 YF-8 粗提物对温和气单胞菌预先形成的生物膜均具有一定的清除效果,清除率分别为 6.70%, 21.72% 和 29.88%。用 6 mg/mL 的 YF-8 粗提物处理时,清除效果最好。

2.6.3 YF-8 粗提物对温和气单胞菌浮游细胞的影响 YF-8 粗提物在清除温和气单胞菌生物膜时,对其浮游细胞的影响如图 4 所示。由图 4 可知,与对照组相比,3 个 sub-MICs 的 YF-8 粗提物均不影响温和气单胞菌浮游细胞的正常生长,表明 YF-8 粗提物对温和气单胞菌没有抑制和杀死的作用。

2.7 光学显微镜分析 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜的抑制和清除作用

2.7.1 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜的抑制 从图 5a~d 中可以看出,对照组中温和气单胞菌菌体相互连接、聚集,形成典型的生物膜结构,而 YF-8 粗提物处理组则随着粗提物质量浓度的

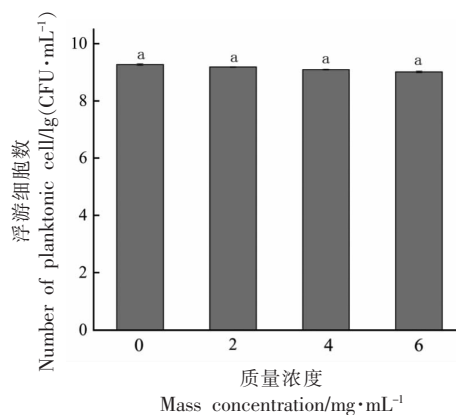
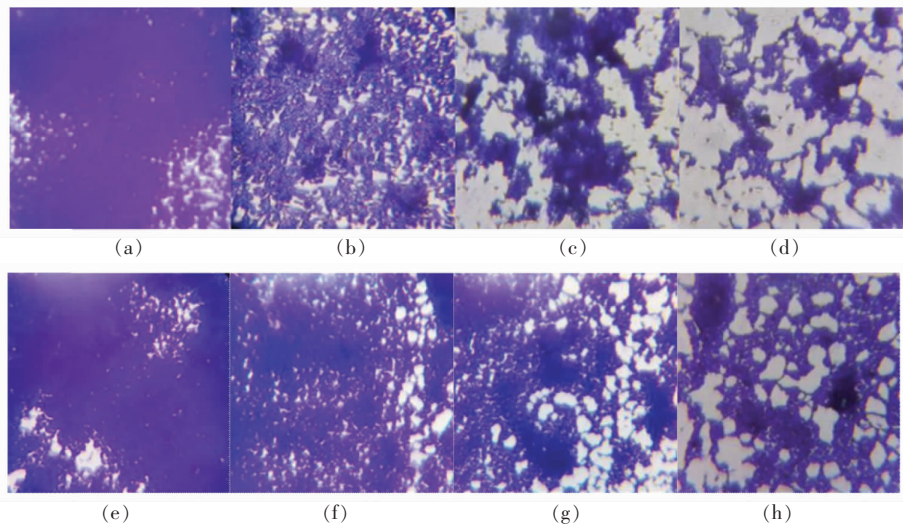


图4 YF-8 粗提物对温和气单胞菌浮游细胞的影响

Fig.4 Effects of YF-8 crude extract on planktonic cells of *A. sobria*

升高,生物膜逐渐稀疏,形成量逐渐减少,菌体逐渐分散,即抑制作用具有剂量效应。当 YF-8 粗提物质量浓度为 6.0 mg/mL 时,抑制作用最强,表明 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜的形成有较好的抑制作用。



注:光镜(1 000 \times);(a)~(d):生物膜抑制;(e)~(h):生物膜清除;从左到右依次为 0,2.0,4.0,6.0 mg/mL YF-8 粗提物处理结果。

图5 光学显微镜分析 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜的抑制和清除作用

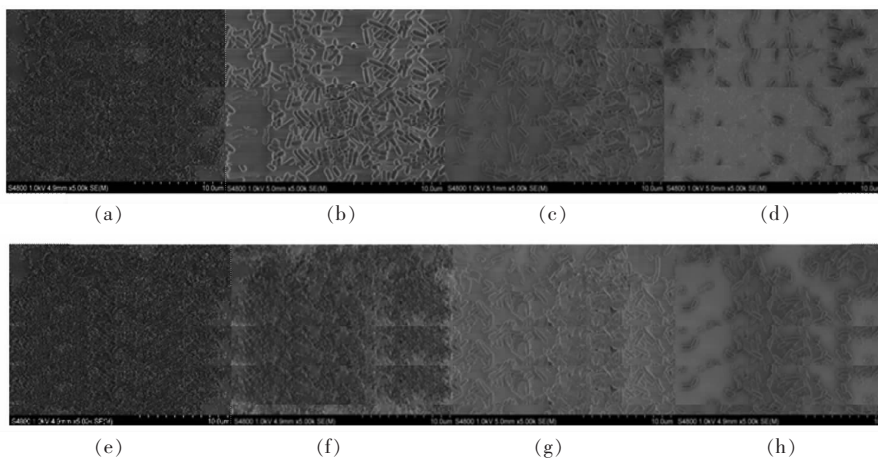
Fig.5 Analysis of the inhibitory and removal effect of YF-8 crude extract on *A. sobria* biofilm by optical microscope

2.7.2 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜的清除 从图 5e~h 可以看出,对照组中大量温和气单胞菌菌体聚集成片状,形成致密的生物膜结构,而 YF-8 粗提物处理组中,虽然细菌仍大量累积,但是随着粗提物质量浓度的升高,生物膜的量逐渐减少,厚度逐渐变薄,结构逐渐变得松散。用 6.0 mg/mL 粗提物处理时,清除效果最好,表明 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜有较好的清除效果。同时,不同质量浓度的 YF-8 粗提物对温和气

单胞菌生物膜结构的影响与定量测定的结果一致。

2.8 扫描电镜分析 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜的抑制和清除作用

2.8.1 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜的抑制 从图 6a~d 中可以看出,对照组中温和气单胞菌微菌落连接形成致密而完整的生物膜结构,而用 YF-8 粗提物处理过的细菌生物膜表现出少量的微菌落以及一些孔隙和通道,表明 YF-8 粗提



注:(a)~(d):生物膜抑制;(e)~(h):生物膜清除;从左到右依次为 0,2.0,4.0,6.0 mg/mL YF-8 粗提物处理结果。

图6 扫描电镜分析 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜的抑制和清除作用

Fig.6 Analysis of the inhibitory and removal effect of YF-8 crude extract on *A. sobria* biofilm by scanning electron microscope

物可能通过这些孔隙和通道引起营养物质的泄漏和生物膜基质的减少,从而抑制温和气单胞菌生物膜的形成。

2.8.2 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜的清除 从图 6e~h 中可以看出,对照组中温和气单胞菌的生物膜结构厚而平坦,而经不同质量浓度的 YF-8 粗提物处理后,温和气单胞菌的生物膜明显被破坏,生物膜量显著降低且厚度明显减小,结构越来越稀疏。此结果与光学显微镜观察到的结果具有一致性,表明 YF-8 粗提物对温和气单胞菌生物膜有较好的清除效果。Younis 等^[17]研究表明,15 mg/mL 海洋链霉菌(*Marine streptomyces*)的次生代谢物处理奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)UCB4 后,对其生物膜的抑制率为 63%,且处理后的奇异变形杆菌在光学显微镜和扫描电镜下生物膜结构稀疏松散,与本研究结果一致。

2.9 YF-8 粗提物对温和气单胞菌 QS 调控基因的影响

LuxI 和 *LuxR* 是与温和气单胞菌 QS 相关的基因,*LuxI* 型蛋白主要负责合成信号分子 AHLs,*LuxR* 型蛋白主要与 AHLs 结合,从而触发毒力因子和生物膜等相关基因的表达^[18]。从图 7 中可以看出,用 6 mg/mL YF-8 粗提物处理温和气单胞菌后,*LuxI* 和 *LuxR* 的表达明显下调,相对表达量分别降低了 69.48%和 80.76%。表明温和气单胞菌 QS 调控基因 *LuxI* 和 *LuxR* 的转录水平均受到 YF-8 粗提物的干扰。QS 调控基因的下调与上述毒力因子的研究结果一致。Li 等^[19]研究发现,蜂房

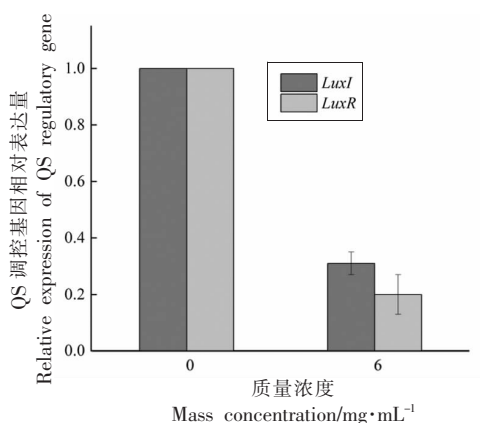


图 7 YF-8 粗提物对温和气单胞菌 QS 调控基因的影响
Fig.7 Effects of YF-8 crude extract on the expression of QS-related genes in *A. sobria*

哈夫尼亚菌(*Hafnia alvei*)经 1.0 mg/mL 的香兰素处理后, QS 调控基因 *halI/halR* 的相对表达量显著下调,下调率分别为 77.40%和 34.30%,并且其 AHLs 的分泌量明显降低,与本研究结果一致。

3 结论

本文主要研究了戊糖片球菌 YF-8 粗提物对温和气单胞菌几种毒力因子及生物膜的影响。结果表明,3 个 sub-MICs (2.0, 4.0 mg/mL 和 6.0 mg/mL)下 YF-8 粗提物对温和气单胞菌的蛋白酶、胞外多糖、嗜铁素、溶血性、运动能力等几种毒力因子和生物膜形成具有明显的抑制作用,且抑制作用具有显著的剂量依赖性。此外,温和气单胞菌 QS 调控基因 *LuxI* 和 *LuxR* 的转录水平明显受到 YF-8 粗提物的干扰。因此,戊糖片球菌 YF-8 可作为淬灭温和气单胞菌 QS 的出发菌株,为控制由温和气单胞菌导致的水产品腐败及病害提供一种新的思路。

参 考 文 献

- [1] KUMAR J S, UMESHA S, PRASAD K S, et al. Detection of quorum sensing molecules and biofilm formation in *Ralstonia solanacearum*[J]. Current Microbiology, 2016, 72(5): 297-305.
- [2] PATNAIK S S, RANGANATHAN S K, AMPASALA D R, et al. Attenuation of quorum sensing regulated virulence and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by *Diaporthe phaseolorum* SSP12[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 118 (20): 117-189.
- [3] TORRES M, RUBIO-PORTILLO E, ANTÓN J, et al. Selection of the *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacterium *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 and of its potential for biocontrol in aquaculture[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7(3): 646-659.
- [4] MELIAN C, SEGLI F, GONZALEZ R, et al. Lactocin AL705 as quorum sensing inhibitor to control *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(3): 911-920.
- [5] 孙梦桐, 吕欣然, 崔天琦, 等. 鱼类肠道中抑制哈维氏弧菌群体感应及生物膜形成的乳酸菌的筛选和鉴定[J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 255-263.

- SUN M T, LÜ X R, CUI T Q, et al. Screening and identification of lactic acid bacteria with inhibitory activity of quorum sensing and biofilm of *Vibrio harveyi* from fish Intestine[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(8): 255–263.
- [6] 李婷婷, 崔方超, 马艳, 等. 群体感应 AHLs 对温和气单胞菌体外致腐因子分泌的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(3): 58–64.
- LI T T, CUI F C, MA Y, et al. Influence of quorum sensing AHLs on spoilage factor secretion of *Aeromonas sobria*[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(3): 58–64.
- [7] GUTIERREZ –PACHECO M M, GONZALEZ –AGUILAR G A, MARTINEZ–TELLEZ M A, et al. Carvacrol inhibits biofilm formation and production of extracellular polymeric substances of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*[J]. Food Control, 2018, 89: 210–218.
- [8] 丁婷, 李勇. 米曲霉来源的环二肽对荧光假单胞菌群体感应的抑制及其机制[J]. 生物加工过程, 2020, 18(2): 234–244.
- DING T, LI Y. Inhibition on quorum sensing of *Pseudomonas fluorescens* by cyclic dipeptide isolated from *Aspergillus oryzae* and its mechanism[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2020, 18(2): 234–244.
- [9] DING T, LI T T, WANG Z, et al. Curcumin liposomes interfere with quorum sensing system of *Aeromonas sobria* and in silico analysis[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 8612.
- [10] SHUI Y S, JIANG Q S, LV X Y, et al. Inhibitory effects of sodium new houthuyfonate on growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 157: 104957.
- [11] DING T, LI T T, LI J R. Identification of natural product compounds as quorum sensing inhibitors in *Pseudomonas fluorescens* P07 through virtual screening[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2018, 26(14): 4088–4099.
- [12] LI T T, CUI F CH, BAI F L, et al. Involvement of acylated homoserine lactones (AHLs) of *Aeromonas sobria* in spoilage of refrigerated turbot[J]. Sensors (Basel Switzerland), 2016, 16(7): 1083–1095.
- [13] NOMURA T. Maturation pathway of hemolysin of *Aeromonas sobria* and the mechanism of action of the hemolysin[J]. Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 2001, 121(7): 481–485.
- [14] KANNAN R D, RAMANATHAN S, ARUNACHALAM K, et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of rosmarinic acid on quorum sensing mediated biofilm formation and virulence factor production in *Aeromonas hydrophila*[J]. Biofouling, 2016, 32(10): 1171–1183.
- [15] SHINODA S, NAKAHARA N, UCHIDA E, et al. Lateral flagellar antigen of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio harveyi* [J]. Microbiology and Immunology, 2013, 29(3): 173–182.
- [16] EMILIE T R, ESTELLE J B, BRIGITTE L. The social life of *Aeromonas* through biofilm and quorum sensing systems[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 37.
- [17] YOUNIS K M, USUP G, AHMAD A. Secondary metabolites produced by *marine streptomyces* as antibiofilm and quorum sensing inhibitor of uropathogen *Proteus mirabilis*[J]. Environmental Science Pollution Research, 2016, 23(5): 4756–4767.
- [18] TANG R, ZHU J L, FENG L F, et al. Characterization of LuxI/LuxR and their regulation involved in biofilm formation and stress resistance in fish spoilers *Pseudomonas fluorescens*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2019, 297: 60–71.
- [19] LI T, HE B, MEI Y, et al. Inhibitory effect of vanillin on the virulence factors and biofilm formation of *Hafnia alvei*[J]. LWT, 2019, 102: 223–229.

Effect of *Pediococcus pentosaceus* YF-8 on the Virulence Factor and Biofilm of *Aeromonas sobria*

Lü Xinran¹, Cui Xiaoling¹, Du Hong¹, Xia Wenjing¹, Bai Fengling^{1*}, Li Jianrong^{1,2}, Wang Mingli³

(¹College of Food Science and Technology, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, The Fresh Food Storage

and Processing Technology Research Institute of Liaoning Provincial Universities, Jinzhou 121013, Liaoning

²Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Dalian 116034, Liaoning

³Penglai Jinglu Fishery Co. Ltd., Yantai 265600, Shandong)

Abstract *Aeromonas sobria* is a common spoilage bacteria in aquatic products, and its spoilage mechanism is closely related to quorum sensing. Therefore, the active substances with quenching quorum sensing activity to control *A. sobria* spoilage ability are being found. In this study, *Pediococcus pentosaceus* YF-8 could degrade *N*-acyl homoserine lactone signal molecule of *A. sobria*. Its inhibition effect on virulence factors, biofilm and quorum sensing regulated genes of *A. sobria* was studied. The results showed that the crude extracts of YF-8 with sub-minimum inhibitory concentration (2.0, 4.0 mg/mL and 6.0 mg/mL) had inhibition effect on the protease, extracellular polysaccharide, siderosin, hemolysis, and swimming capacity of *A. sobria*, and the inhibition rates reached 9.6%–32.72%, 17.91%–58.09%, 19.04%–44.35%, 19.21%–51.49% and 51.61%–93.55%, respectively. Meanwhile, the inhibition rate was concentration-dependent. In addition, the inhibition rate and clearance rate of YF-8 crude extracts with the three sub-MICs on *A. sobria*'s biofilm reached 31.28%–66.64% and 6.7%–29.88%, and the thickness of biofilm became thin and the bacteria were sparse and loose. At the same time, the 6.0 mg/mL YF-8 crude extracts down-regulated expression of the *LuxI* and *LuxR* genes regulated quorum sensing of *A. sobria*, and the inhibition rate reached 69.48% and 80.76%. This study will provide a new idea for controlling the corruption and disease of aquatic products caused by *A. sobria*.

Keywords *Pediococcus pentosaceus*; *Aeromonas sobria*; quorum sensing quenching; virulence factor; biofilm