

群体感应抑制剂对发酵乳杆菌生物膜生成的影响

郑砚学, 张悦, 王艳, 聂丽丽, 乔瑞芳, 贺银凤*

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院 呼和浩特 010018)

摘要 以课题组前期筛选出的 2 株高产信号分子 AI-2 的发酵乳杆菌 2-1 和 211 为研究对象, 选择 *D*-半乳糖、*D*-核糖和呋喃酮作为群体感应抑制剂, 采用化学发光法和结晶紫染色法测定 2 株发酵乳杆菌的 AI-2 活性以及生物膜形成量。结果表明: 一定浓度的 3 种抑制剂都可以抑制 2 株发酵乳杆菌信号分子 AI-2 的活性, 其中 200 $\mu\text{mol/L}$ *D*-核糖对菌株 2-1 AI-2 活性抑制效果最好, 抑制率为 19.65%, 50 $\mu\text{mol/L}$ *D*-核糖对菌株 211 AI-2 的活性抑制效果最好, 抑制率为 28.57%; 同时不同浓度的抑制剂对 2 株发酵乳杆菌的生物膜形成量都有一定的抑制作用, 对其生长量的影响并不显著。扫描电镜结果显示添加 *D*-核糖对 2 株发酵乳杆菌生物膜状态下的菌体形态虽无明显影响, 但会降低细菌的黏附性。

关键词 群体感应抑制剂; 发酵乳杆菌; 生物膜; 信号分子 AI-2

文章编号 1009-7848(2022)11-0037-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.11.005

乳酸菌是一类可发酵糖产生乳酸的革兰氏阳性菌, 其作为公认的食品级益生菌, 对人体有多种益生功能, 在营养健康和食品保藏与发酵方面具有广泛的应用价值^[1]。乳酸菌在一定的环境中通常以生物膜形式生存, 生物膜是指细菌附着在一些物体表面后分泌胞外黏性聚合物, 并在其中生长繁殖, 最终形成的菌落聚集体^[2-3]。有研究报道生物膜状态下的乳酸菌比浮游态的乳酸菌存活能力更强, 具有更强大的耐环境胁迫能力和免疫调节能力^[4-5]。加强对乳酸菌生物膜研究对阐明益生菌益生机理以及未来研究益生菌制剂具有重要意义。

现有研究表明, 群体感应 (Quorum sensing, QS) 在细菌生物膜形成的过程中起重要作用, QS 系统是指细菌通过向周围环境释放一种特殊的化学信号分子来感知环境变化, 从而调控相关基因的表达, 以激活特定的行为并进行信息交流^[6]。在自然界中, 大多数细菌都以生物膜形式生存, QS 系统也普遍存在于不同细菌中, 乳酸菌也不例外^[7]。LuxS/AI-2 型 QS 系统在乳酸菌种间信号交流中发挥着重要作用, 在 LuxS/AI-2 型 QS 系统中, 由 luxS 基因介导的信号分子 AI-2 在革兰氏阳性和阴性细菌中广泛存在, 信号分子 AI-2 也是乳酸菌

形成生物膜的重要因素^[8]。

群体感应抑制剂 (Quorum sensing inhibitors, QSIs) 是指通过抑制细菌群体感应中一些特定基因的表达来阻止细胞的通讯交流, 而对细菌生长影响小的物质^[9]。目前 QSIs 可通过抑制信号分子合成、传递和接受等途径来抑制细菌的 QS^[10]。AI-2 系统是细菌最普遍存在的一种 QS 系统, 一般可通过抑制 AI-2 合成过程中酶的活性, 干扰信号分子 AI-2 的接受或转导来抑制 AI-2 系统^[11]。现有研究表明, 乳酸菌利用 LuxS/AI-2 型 QS 系统与周围环境中的其它细菌进行交流, 利用 AI-2 信号分子反馈的信号来调控相关基因的表达, 如生物膜的形成^[12]。目前对于 AI-2 介导的 QS 与生物膜的研究多集中于致病菌, 对乳酸菌的 QS 和生物膜研究还较少, 在实际生产加工和进入肠道后, 乳酸菌大多以生物膜形式存在^[13-14], 因此有必要加强对乳酸菌 QS 系统对生物膜调控的研究。

乳酸菌作为人体肠道内的有益微生物, 通常以生物膜形态来提高其对外界不良环境的抗性。现有研究表明, 群体感应可以调控乳酸菌生物膜的形成, 然而, AI-2 作为群体感应的信号分子是否参与乳酸菌生物膜形成的过程还有待研究。本试验以课题组前期筛选出的 2 株高产信号分子 AI-2 的发酵乳杆菌为研究对象, 选择 *D*-半乳糖、*D*-核糖和呋喃酮作为 QSIs, 通过添加不同种类以及不同浓度的 QSIs, 测定其对菌株 AI-2 活性、生长量和生物膜形成量的影响。选择抑制信号分子

收稿日期: 2021-11-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960467); 内蒙古自治区自然科学基金项目(2019BS03002)

第一作者: 郑砚学, 女, 硕士生

通信作者: 贺银凤 E-mail: heyinf6468@163.com

AI-2 活性最好的抑制剂及最适浓度,测定其对菌体形态和生物膜形态的影响,探究乳酸菌生物膜的形成与信号分子 AI-2 活性之间的关系,为进一步研究乳酸菌群体感应系统对生物膜的调控作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种 试验菌株 2-1 和 211 均为发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermentum*), 分别分离自锡盟地区酸马奶和西藏地区牦牛乳制品中, 现保存于内蒙古农业大学食品生物技术团队。

哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) BB170, 购买自美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。

1.1.2 培养基 试验所用到的 AB 培养基参考燕彩铃^[5]的方法配制。MRS 肉汤培养基, 购自广东环凯微生物科技有限公司; D-半乳糖、D-核糖、呋喃酮, 购自 Aladdin 公司; 结晶紫、氯化钠、MgSO₄·7H₂O、乙酸, 购自国药集团化学试剂有限公司; 甲醇, 购自天津永晟精细化工有限公司; 酸水解酪蛋白, 购自 Coolaber 公司; 无水乙醇, 购自天津福晨化学试剂有限公司; 叔丁醇, 购自麦克林公司; 试验中使用的水均为去离子水。

1.1.3 仪器与设备 HF-SAFE 1500 型生物安全柜、SMART-N 纯水机, 力康生物医疗科技控股有限公司; SX-500 型全自动高压灭菌锅, 日本 TOMY 公司; PB 10 型酸度计, 德国 Sartorius 公司; 5810R 型高速低温离心机, 德国 Eppendorf 公司; BioTek Epoch 全波长酶标仪, 美国 BioTek 公司; TM4000 形桌上显微镜, 日本株式会社日立高新技术那珂事业所。

1.2 方法

1.2.1 供试菌液的制备 将 2 株发酵乳杆菌以体积分数 2.0% 接种量接种于 MRS 培养基中活化培养二代后, 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液后加入 0.85% 的生理盐水, 吹打混匀后离心 3 次以洗涤菌体, 洗涤后加入 0.85% 的生理盐水调节菌液的吸光度 OD_{595nm} 值在 1.0 左右。此时细菌的细胞浓度为 1×10⁷ CFU/mL, 由此制得试验菌株的供试菌液^[16]。

1.2.2 无细胞发酵上清液的制备 将试验菌株待测培养液于 8 000 r/min 离心 5 min (4 ℃), 使用 0.22 μm 水系滤膜对上清液过滤除菌, 即得到试验菌株的无细胞发酵上清液 (Cell-free fermentation supernatant, CFS)。将哈维氏弧菌 BB170 培养 3 代至 OD_{595nm} 为 1.0 左右后, 8 000 r/min 离心 5 min (4 ℃), 使用 0.22 μm 水系滤膜对上清液过滤除菌, 即得到阳性对照。AB 培养基过滤除菌即阴性对照, MRS 培养基过滤除菌即介质对照。无菌 CFS 或对照样品于 -80 ℃ 保存^[17]。

1.2.3 信号分子 AI-2 活性的测定 将哈维氏弧菌 BB170 以 2.0% 接种量接种到 AB 培养基中, 30 ℃ 振荡培养 3 代至 OD_{595nm} 为 1.0 左右后, 按 1:5 000 (体积比) 将菌液和 AB 培养基混合稀释, 稀释后哈维氏弧菌 BB170 菌液约为 10⁵ CFU/mL。将试验菌株的 CFS、阳性、阴性、介质对照与稀释后的哈维氏弧菌 BB170 菌液以 1:100 (体积比) 混合后, 30 ℃ 振荡培养。在 0~6 h 内, 每隔 30 min 在化学发光模式下测定其荧光强度值。当阴性对照荧光强度值达到最低点时, 测定待测样品的荧光强度, 计算样品相对荧光强度用以代表菌株信号分子 AI-2 的活性^[18]。

1.2.4 QSIs 的筛选 在灭菌后的 MRS 液体培养基中添加用 0.22 μm 水系滤膜过滤的 QSIs, 使 QSIs 终浓度分别为 50, 100, 150, 200, 500, 1 000, 2 000, 10 000, 20 000 μmol/L, 对照组为不添加 QSIs (0 μmol/L)。将活化好的试验菌株接入已添加 QSIs 的 MRS 液体培养基中, 静置培养到待测时间后用全波长多功能酶标仪检测菌体密度 (OD_{595nm}), 同时 8 000 r/min 离心 5 min (4 ℃), 收集上清液, 对各上清液进行 AI-2 活性检测。计算不同种类以及不同浓度的 QSIs 对乳酸菌信号分子 AI-2 的抑制率, 计算公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{AI-2 活性(样品)} - \text{AI-2 活性(对照)}}{\text{AI-2 活性(对照)}}$$

根据对信号分子 AI-2 活性的抑制率得出最佳 QSIs 以及最佳浓度。

1.2.5 QSIs 对菌株生物膜形成量的影响 将活化好的试验菌株以体积分数 2% 的接种量接入到添加了不同浓度 QSIs 的 MRS 液体培养基中, 96 孔

酶标板中每孔加入 200 μL 后 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养, 培养到待测时间后, 用结晶紫染色法测定生物膜形成量 ($\text{OD}_{595\text{nm}}$)^[19]。

1.2.6 QSIs 对乳酸菌菌体形态和生物膜形态的影响 将活化二代的试验菌株接入已添加不同浓度 QSIs 的 MRS 液体培养基中, 制备浮游和被膜态菌株^[20], 培养到待测时间后, 浮游态菌株 8 000 r/min 离心 5 min, 弃上清留菌泥, 被膜态菌株弃培养液, 分别使用终体积分数 2.5% 的戊二醛固定, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜后使用乙醇梯度脱水, 使用叔丁醇梯度脱乙醇后干燥, 使用扫描电镜观察菌体形态结构和生物膜结构。

1.3 数据分析

利用 SPSS 23.0 和 Origin 2018 进行数据分析及作图, 测定结果以平均值 \pm 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 发酵乳杆菌信号分子分泌规律以及生物膜形成规律的探究

2 株发酵乳杆菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 25 h, 从 4 h 开始, 每隔 3 h 取样测定菌体生长量、生物膜形成

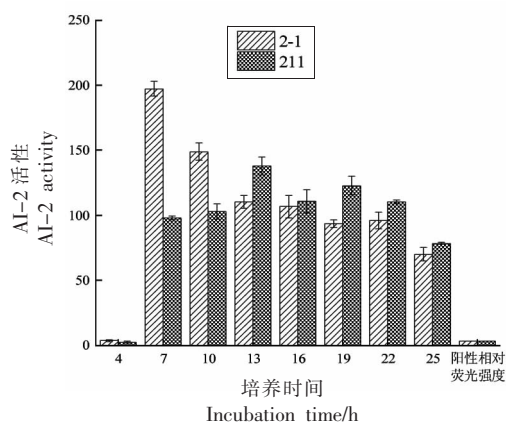


图 1 发酵乳杆菌信号分子 AI-2 的活性

Fig.1 The active secretion of signal molecule AI-2 of *L. fermentum*

2.2 QSIs 对发酵乳杆菌产信号分子 AI-2 的影响

2.2.1 D-半乳糖对发酵乳杆菌产信号分子 AI-2 的影响 有研究报道, D-半乳糖的结合蛋白与信号分子 AI-2 受体具有一定的结构相似性, D-半

量以及信号分子 AI-2 的活性。

图 1 为 2 株发酵乳杆菌在不同培养时间下信号分子 AI-2 的活性。由图可知, 与阳性相对荧光强度相比, 从 7 h 开始, 2 株发酵乳杆菌的信号分子活性均高于阳性相对荧光强度, 说明 2 株发酵乳杆菌具备分泌信号分子 AI-2 的能力, 同时发酵乳杆菌 2-1 7 h 的 AI-2 活性远高于其它时间的 AI-2 活性, 发酵乳杆菌 211 13 h 的 AI-2 活性高于其它时间的 AI-2 活性, 所以选择培养 7 h 的发酵乳杆菌 2-1 和培养 13 h 的发酵乳杆菌 211 用于后续筛选 QSIs 及其对乳酸菌生物膜形成的影响。

图 2 为 2 株发酵乳杆菌生长量与生物膜形成的关系图。由图可知, 4~10 h 为 2 株发酵乳杆菌生长的对数期, 10 h 以后菌体生长达到稳定; 2 株发酵乳杆菌在 4~13 h 的生物膜形成量呈递增趋势, 在 13 h 生物膜形成量达到最大。发酵乳杆菌 2-1 的生物膜在 13 h 后呈先下降再上升类似波浪的趋势, 发酵乳杆菌 211 生物膜的生成是一个先增长后降低再增长的过程。

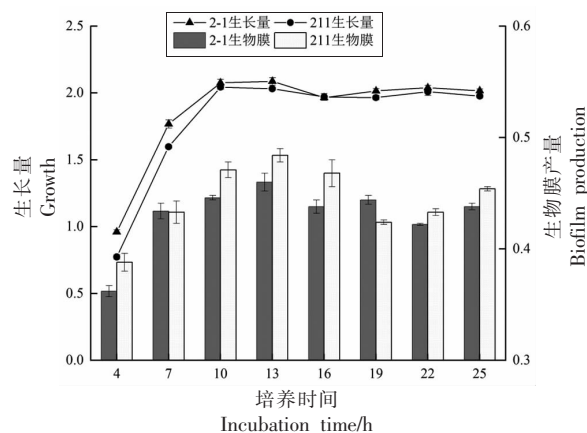


图 2 发酵乳杆菌生物膜的形成

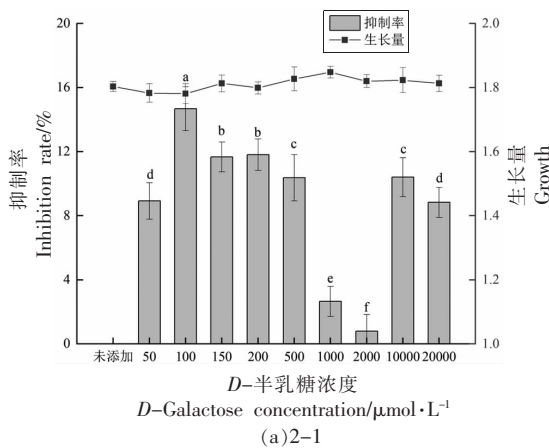
Fig.2 The biofilm formation of *L. fermentum*

乳糖可能会与信号分子 AI-2 竞争 AI-2 受体, 影响 AI-2 与 AI-2 受体的结合率, 从而降低 AI-2 发挥的作用^[21-23]。

在 MRS 培养基中添加不同浓度的 D-半乳糖来评价其对 2 株发酵乳杆菌生长量以及 AI-2 活

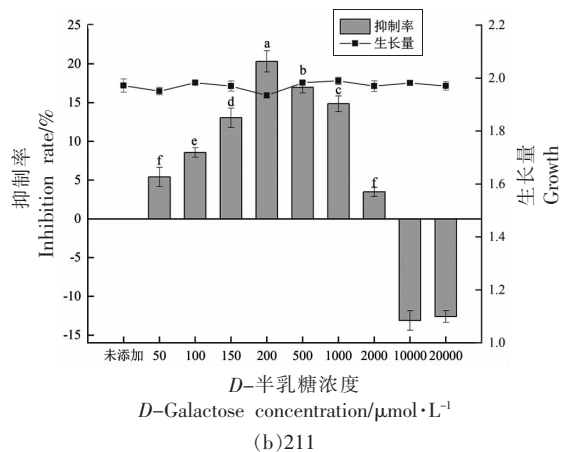
性的影响,对照组为不添加 *D*-半乳糖($0 \mu\text{mol/L}$)。如图 3 所示,添加不同浓度的 *D*-半乳糖对 2 株发酵乳杆菌的生长量均无显著影响,说明 *D*-半乳糖对菌株的生长不起能量来源的作用。

由图 3a 可知,添加不同浓度的 *D*-半乳糖对发酵乳杆菌 2-1 的 AI-2 活性有一定程度的抑制,终浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 的 *D*-半乳糖对 AI-2 活性抑制效果最好,抑制率为 14.68%。在 $100 \sim 2000 \mu\text{mol/L}$ 范围内,随着 *D*-半乳糖终浓度的增加,其对 AI-2 活性的抑制作用降低,可能是当 *D*-半乳



糖结合蛋白和 AI-2 受体浓度一定,而 *D*-半乳糖浓度较高时,其更容易与 *D*-半乳糖结合蛋白结合从而降低了其与信号分子 AI-2 的竞争作用。

如图 3b 所示,与对照组相比,随着 *D*-半乳糖浓度的增加,其对发酵乳杆菌 211 AI-2 活性的抑制作用增加,终浓度为 $200 \mu\text{mol/L}$ 的 *D*-半乳糖对发酵乳杆菌 211 的 AI-2 活性影响最大,其抑制率为 20.33%。随着 *D*-半乳糖浓度的增加,对 AI-2 活性的抑制作用降低,甚至有一定的促进作用。



注:不同字母代表差异显著($P < 0.05$),下同。

图 3 *D*-半乳糖对发酵乳杆菌信号分子 AI-2 活性的影响

Fig.3 The effect of *D*-galactose on the activity of signal molecule AI-2 by *L. fermentum*

2.2.2 *D*-核糖对发酵乳杆菌产信号分子 AI-2 的影响 有研究显示,*D*-核糖不会产生毒性作用且与 AI-2 有一定的结构相似性,因此,*D*-核糖和 AI-2 可以同时竞争 AI-2 受体来降低 AI-2 的作用^[24]。目前,*D*-核糖可被用作 QSIs 来抑制致病菌的生物膜形成。

本试验测定了在 MRS 培养基中添加不同浓度的 *D*-核糖对 2 株发酵乳杆菌生长量及 AI-2 活性的影响,对照组为不添加 *D*-核糖($0 \mu\text{mol/L}$)。如图 4 所示,添加不同浓度的 *D*-核糖不影响 2 株发酵乳杆菌的生长。

由图 4a 可知, $200 \mu\text{mol/L}$ 的 *D*-核糖对发酵乳杆菌 2-1 AI-2 活性的抑制效果最好,抑制率为 19.65%,而后随着 *D*-核糖的浓度增加,其对 AI-2 活性的抑制作用降低且呈现出负作用,可能是 *D*-核糖作为与 AI-2 的结构相似物,一定浓度下可以与 AI-2 共同竞争 AI-2 受体从而起抑制作用。

如图 4b 所示,与对照组相比,添加 $50 \mu\text{mol/L}$ 的 *D*-核糖对发酵乳杆菌 211 的 AI-2 的活性抑制效果最好,抑制率为 28.57%,而后随着 *D*-核糖浓度的增加,其对 AI-2 的抑制效果整体呈降低趋势。

2.2.3 呋喃酮对发酵乳杆菌产信号分子 AI-2 的影响 有研究报道,呋喃酮类化合物与信号分子 AI-2 结构有一定的相似性,作为 AI-2 信号分子的同系物,其在控制致病菌感染和生物膜的形成方面具有良好的应用价值^[25]。在 MRS 培养基中添加不同浓度的呋喃酮来评价其对 2 株发酵乳杆菌生长量及 AI-2 活性的影响,对照组为不添加呋喃酮($0 \mu\text{mol/L}$)。如图 5 所示,添加一定浓度的呋喃酮对 2 株发酵乳杆菌的生长量影响不明显。

与对照组相比,随着呋喃酮浓度的增加,其对发酵乳杆菌 2-1 AI-2 活性的抑制作用逐渐增加, $200 \mu\text{mol/L}$ 的呋喃酮与其它浓度相比抑制效果最

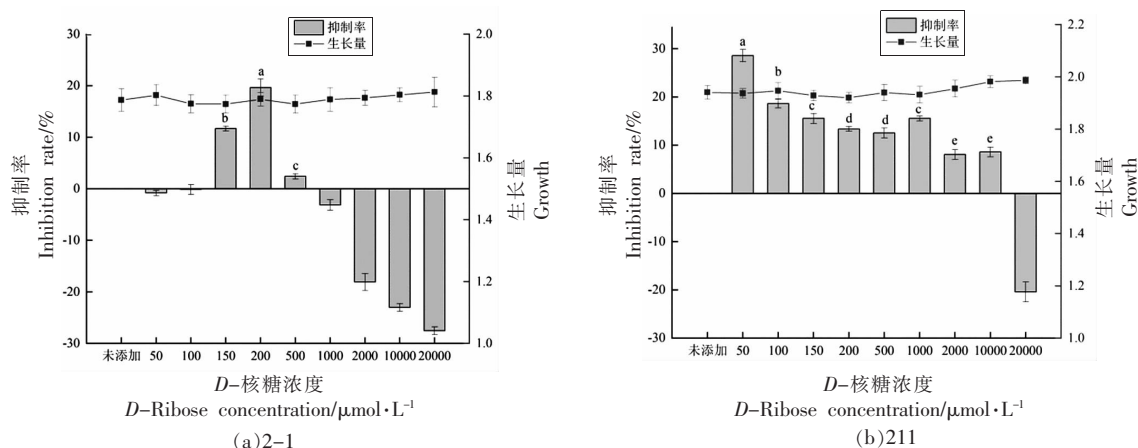


图 4 D-核糖对发酵乳杆菌信号分子 AI-2 活性的影响

Fig.4 The effect of D-ribose on the signal molecule AI-2 produced by *L. fermentum*

好,抑制率为 13.27%,后随着呋喃酮浓度的增加, AI-2 活性增强,可能是呋喃酮类化合物作为 AI-2 信号分子的结构相似物,在一定浓度下可以抑制 AI-2 的活性,当超过抑制浓度的阈值时,呋喃酮类化合物则会对增强菌株产 AI-2 的能力。

与对照组相比,50 $\mu\text{mol/L}$ 的呋喃酮对发酵乳杆菌 211 AI-2 活性的抑制最明显,抑制率为 13.51%,而后随着添加呋喃酮浓度的增高,其对 AI-2 活性的抑制作用不明显,甚至存在促进作用。

呋喃酮类化合物可与 AI-2 竞争结合 AI-2 受

体蛋白从而抑制其 QS^[26],而在本试验中呋喃酮对 2 株发酵乳杆菌的 AI-2 活性抑制效果并不明显,可能是因为不同的菌株 AI-2 受体的结构不同,所以对其 QS 的抑制作用也不相同。吴雅茜等^[27]研究了 4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮(DMHF)对单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, *L.monocytogenes*) 的生长与信号分子 AI-2 活性的影响,结果表明 DMHF 能延迟单增李斯特菌的生长,且能明显抑制单增李斯特菌 AI-2 的活性,由此可认为 DMHF 是 AI-2 类 QS 的抑制剂。

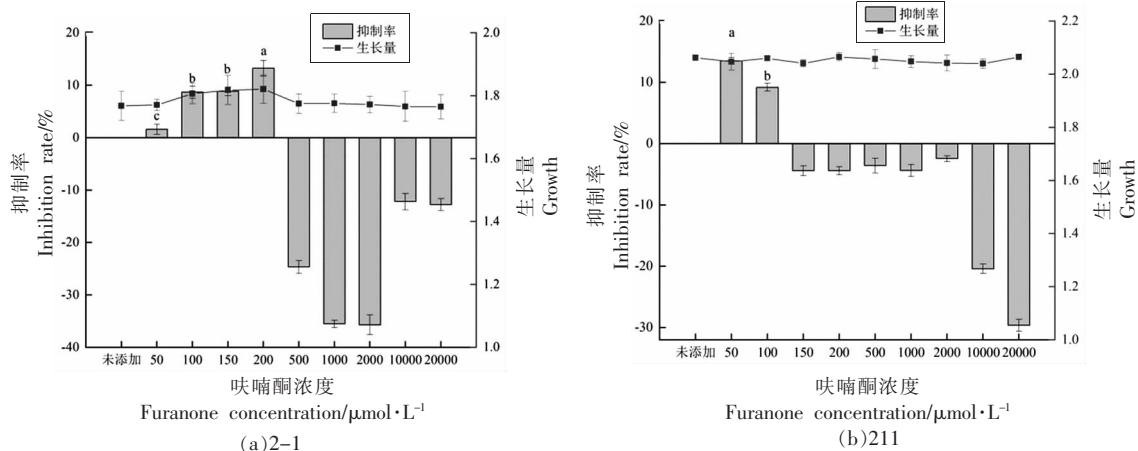


图 5 呋喃酮对发酵乳杆菌信号分子 AI-2 活性的影响

Fig.5 The effect of furanone on the signal molecule AI-2 produced by *L. fermentum*

2.3 QSIs 对发酵乳杆菌生物膜形成量的影响

2.3.1 D-半乳糖对发酵乳杆菌生物膜形成量的影响 本试验测定了添加不同浓度的 D-半乳糖对 2 株发酵乳杆菌生物膜形成量的影响。由图 6 可知,

与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)相比,添加不同浓度的 D-半乳糖对 2 株发酵乳杆菌生物膜形成量有不同程度的影响,其中添加 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 D-半乳糖对发酵乳杆菌 2-1 的生物膜形成量抑制作用明显,添加

2 000 $\mu\text{mol/L}$ 的 *D*-半乳糖对发酵乳杆菌 211 的生物膜形成量的抑制作用最强,这与 Ryu 等^[28]研究的 *D*-半乳糖对牙周致病菌生物膜的抑制作用结果相似,即一定浓度下的 *D*-半乳糖可以抑制牙周

致病菌的生物膜形成且不影响细菌生长,说明 *D*-半乳糖可能与 AI-2 竞争 AI-2 受体,通过降低 AI-2 活性来预防细菌生物膜的形成。

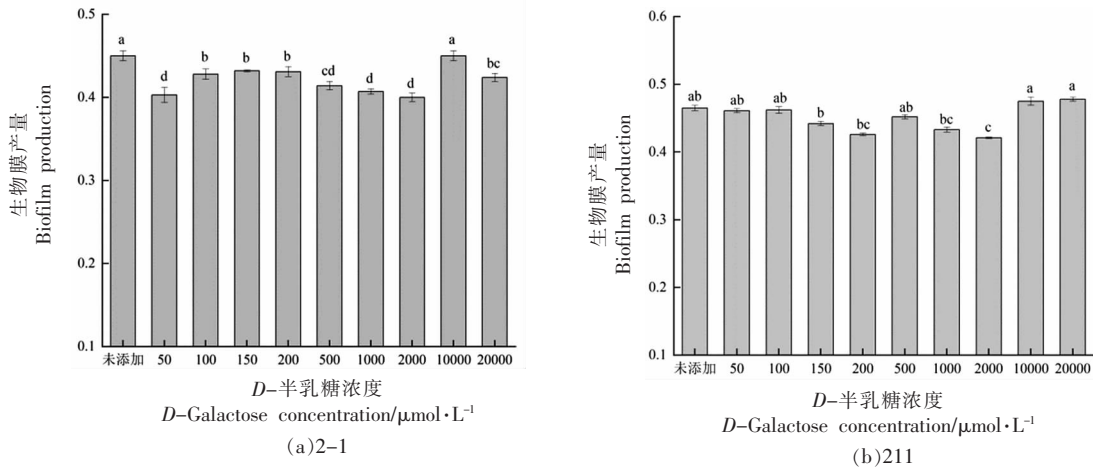


图6 *D*-半乳糖对发酵乳杆菌生物膜形成量的影响

Fig.6 The effect of *D*-galactose on the formation of *L. fermentum* biofilm

2.3.2 *D*-核糖对发酵乳杆菌生物膜形成量的影响 本试验测定了添加不同浓度的 *D*-核糖对 2 株发酵乳杆菌生物膜形成量的影响。由图 7 可知,与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)相比,添加不同浓度的 *D*-核糖对发酵乳杆菌 2-1 的生物膜形成量都有一定的抑制作用,而对发酵乳杆菌 211 的生物膜形成量

抑制效果不明显。Liu 等^[29]研究了 *D*-核糖对类植物乳杆菌 L-ZS9 AI-2 活性的抑制作用,与外源添加 AI-2 相比,一定浓度的 *D*-核糖虽可以抑制 L-ZS9 的 AI-2 活性和生物膜形成,但外源 AI-2 和 *D*-核糖对类植物乳杆菌 L-ZS9 的生长没有影响,这与本试验研究结果相似。

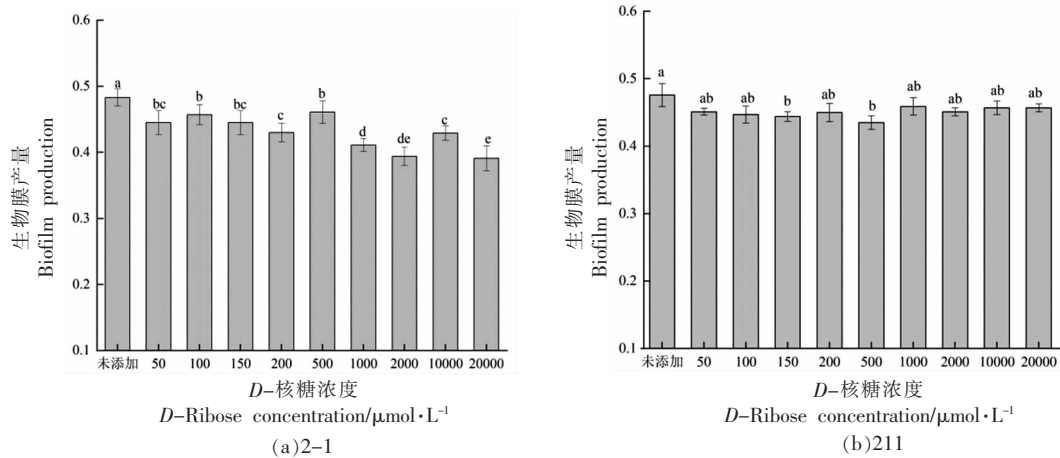


图7 *D*-核糖对发酵乳杆菌生物膜形成量的影响

Fig.7 The effect of *D*-ribose on the formation of *L. fermentum* biofilm

2.3.3 不同浓度的呋喃酮对发酵乳杆菌生物膜形成量的影响 本试验测定了添加不同浓度的呋喃酮对 2 株发酵乳杆菌生物膜形成量的影响。如图 8 所示,与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)相比,不同浓度的呋

喃酮对发酵乳杆菌 2-1 的生物膜形成量有显著的抑制作用,而发酵乳杆菌 211 生物膜形成量的抑制作用并不明显。杨维等^[30]研究了 3,4-二溴-2 (5H)-呋喃酮对单增李斯特菌生物膜形成的影

响,发现呋喃酮对单增李斯特菌生物膜的形成有一定的抑制作用,随着呋喃酮浓度的增加,其对生

物膜形成量的抑制效果更明显。

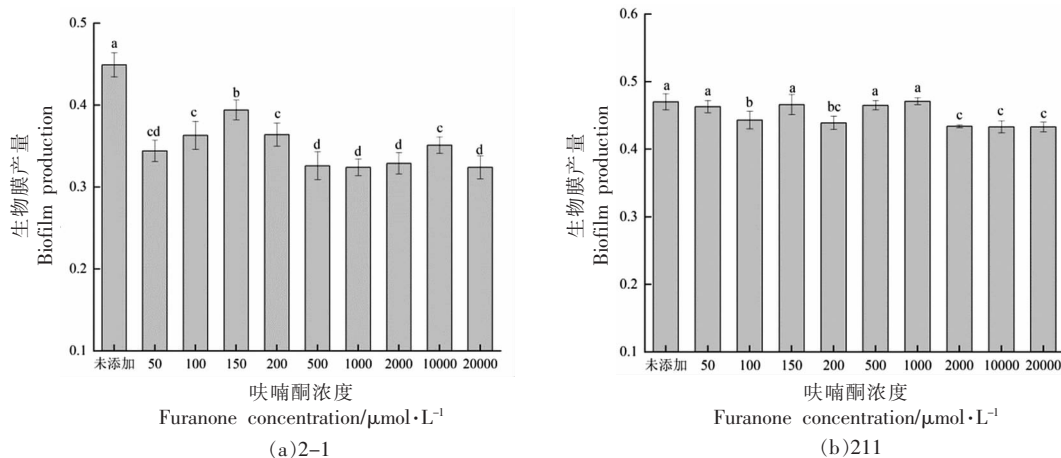


图 8 呋喃酮对发酵乳杆菌生物膜形成量的影响

Fig.8 The effect of furanone on the formation of *L. fermentum* biofilm

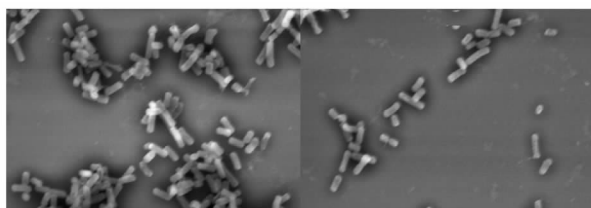
2.4 QSIs 对发酵乳杆菌菌体形态和生物膜形态的影响

根据前期试验最终选择 $200 \mu\text{mol/L}$ 和 $50 \mu\text{mol/L}$ 的 *D*-核糖分别作为发酵乳杆菌 2-1 和发酵乳杆菌 211 的 QSIs,并对添加了 *D*-核糖的 2 株发酵乳杆菌使用扫描电镜观察菌体形态结构,结果如图所示。

图 9 为发酵乳杆菌 2-1 培养 24 h 细菌的生物膜状态下的菌体形态。由图 9a 可以看出,未添加 *D*-核糖的菌株整体形态完好,细胞表面平整光滑,多成聚集状态,说明生物膜状态下细菌的黏附性更高。由图 9b 可以看出,添加 $200 \mu\text{mol/L}$ *D*-核

糖的细菌整体形态以及表面光滑度虽未发生改变,但细菌聚集度下降,游离细菌增多,说明一定浓度的 *D*-核糖可以降低菌体的黏附性。

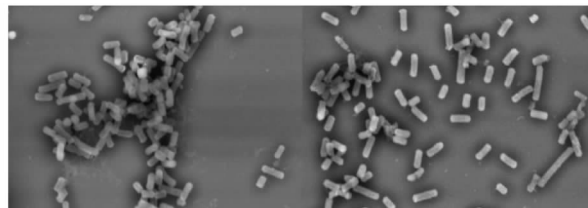
图 10 为发酵乳杆菌 211 培养 24 h 细菌的生物膜状态下的菌体形态。由图 10a 可以看出,未添加 *D*-核糖的菌整体形态完好,细胞整体聚集度较高,说明生物膜状态下细菌之间的黏附性更强。由图 10b 可以看出,添加 $50 \mu\text{mol/L}$ *D*-核糖的细菌整体形态虽未发生改变,但游离细菌居多,细菌整体聚集能力下降,说明一定浓度的 *D*-核糖可以降低菌株之间的黏附性,这与发酵乳杆菌 2-1 结果相似。



(a)未添加 *D*-核糖(5 000 \times) (b)添加 $200 \mu\text{mol/L}$ *D*-核糖(5 000 \times)

图 9 *D*-核糖对发酵乳杆菌 2-1 菌体形态的影响

Fig.9 The effect of *D*-ribose on the morphology of *L. fermentum* 2-1



(a)未添加 *D*-核糖(5 000 \times) (b)添加 $50 \mu\text{mol/L}$ *D*-核糖(5 000 \times)

图 10 *D*-核糖对发酵乳杆菌 211 菌体形态的影响

Fig.10 The effect of *D*-ribose on the morphology of *L. fermentum* 211

3 结论

3 种 QSIs 虽对 2 株发酵乳杆菌的信号分子 AI-2 活性都有一定的抑制作用,但不同种类以及

不同浓度的 QSIs 对 AI-2 活性的影响效果不同;不同种类以及不同浓度的 QSIs 对菌株生长量的影响效果虽不显著,但在一定程度上都能抑制 2

株发酵乳杆菌生物膜的形成。最终根据3种QSIs对2株发酵乳杆菌AI-2活性以及生物膜形成量筛选出200 $\mu\text{mol/L}$ 的D-核糖作为发酵乳杆菌2-1的QSIs;选择50 $\mu\text{mol/L}$ 的D-核糖作为发酵乳杆菌211的QSIs。对添加了D-核糖的2株发酵乳杆菌使用扫描电镜观察菌体形态结构,结果发现D-核糖对2株发酵乳杆菌的生物膜状态下的菌体形态虽无明显影响,但降低了被膜态菌株的黏附性,为后续研究乳酸菌群体感应系统与生物膜之间的关系提供了依据。

参 考 文 献

- [1] 朱寒剑,李雷兵,郑心,等. 乳酸菌生物膜形成调控及在食品中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(5): 296-304.
ZHU H J, LI L B, ZHENG X, et al. Research progress in understanding the formation and regulation of lactic acid bacteria biofilm and its application in foods[J]. Food Science, 2021, 42(5): 296-304.
- [2] BRUCK H L, DELVIGNE F, DHULSTER P, et al. Molecular strategies for adapting *Bacillus subtilis* 168 biosurfactant production to biofilm cultivation mode[J]. Bioresource Technology, 2019, 293: 122090.
- [3] 刘蕾,刘义,李平兰. 益生菌生物被膜的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(9): 214-219.
LIU L, LIU Y, LI P L. Progress in research on biofilm formation by probiotics[J]. Food Science, 2016, 37(9): 214-219.
- [4] RIEU A, AODIA N, JEGO G, et al. The biofilm mode of life boosts the anti-inflammatory properties of *Lactobacillus*[J]. Cellular Microbiology, 2014, 16(12): 1836-1853.
- [5] CHEOW W S, KIEW T Y, HADINOTO K. Controlled release of *Lactobacillus rhamnosus* biofilm probiotics from alginate-lucust bean gum microcapsules[J]. Carbohydrate Polymers, 2014, 103(4): 587-595.
- [6] 朱鹏. AI-2型细菌群体感应抑制剂的设计、合成及活性研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.
ZHU P. Design, synthesis and biological evaluation of AI-2 bacterial quorum sensing inhibitors[D]. Jinan: Shandong University, 2012.
- [7] 郭慧颖,韩雪,张丽娟,等. 群体感应系统及其在乳酸菌生物膜形成中的作用[J]. 食品工业科技, 2018, 39(1): 318-322.
WU H Y, HAN X, ZHANG L J, et al. Quorum sensing system and its role in regulation of biofilm formation in lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(1): 318-322.
- [8] 邓墨曦,音建华,汪海峰. 乳酸菌群体感应与其肠道生物膜形成的研究进展[J]. 微生物学报, 2018, 58(11): 1970-1978.
DENG Z X, YIN J H, WANG H F. Progress in research on quorum sensing and intestinal biofilm formation of *Lactobacillus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(11): 1970-1978.
- [9] LOU Z, WANG H, TANG Y, et al. The effect of burdock leaf fraction on adhesion, biofilm formation, quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(3): 615-624.
- [10] 莫祯妮,熊盈盈,邱树毅,等. 群体感应抑制剂在食源性微生物中调控生物膜形成的研究进展[J]. 食品科学, 2021, 42(17): 307-316.
MO Z N, XIONG Y Y, QIU S Y, et al. Progress in quorum sensing inhibitors in regulating biofilm formation of foodborne microorganisms[J]. Food Science, 2021, 42(17): 307-316.
- [11] 陈垂继,周颖,陈中山,等. 致病菌群体感应系统及其抑制剂的研究进展[J]. 华南国防医学杂志, 2017, 31(4): 286-290.
CHEN C J, ZHOU Y, CHEN Z S, et al. Research progress of pathogen quorum sensing system and its inhibitors[J]. South China Journal of Defense Medicine, 2017, 31(4): 286-290.
- [12] 蔡针华. 群体感应信号分子AI-2高产乳酸菌株筛选及特性研究[D]. 太原: 山西师范大学, 2018.
CAI Z H. Screening and characterization research of quorum sensing signaling molecule AI-2 high-yield *Lactobacillus* strains[D]. Taiyuan: Shanxi Normal University, 2018.
- [13] ABEE T, ÁKOS T KOVÁCS, KUIPERS O P, et al. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 22(2): 172-179.
- [14] SALAS-JARA M J, ILABACA A, VEGA M, et al. Biofilm forming *Lactobacillus*: New challenges for the development of probiotics [J]. Microorganisms,

- 2016, 4(3): 35.
- [15] 燕彩玲. 乳酸菌产信号分子 AI-2 的研究及其与生物膜形成的关系[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
- YAN C L. Study on the signal molecule Autoinducer-2 in lactic acid bacteria and its role in biofilm formation [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2016.
- [16] HU M X, LI J N, GUO Q, et al. Probiotics biofilm-integrated electrospun nanofiber membranes: A new starter culture for fermented milk production [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(11): 3198-3208.
- [17] 顾悦. 环境胁迫及酵母菌对乳酸菌 LuxS/AI-2 群体感应系统的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.
- GU Y. The effects of environmental stresses and yeast on LuxS/AI-2 quorum sensing system of lactic acid bacteria[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2017.
- [18] 吴荣. 信号分子 AI-2 对乳酸菌生物膜形成的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- WU R. Effect of signal molecule AI-2 on biofilm formation of lactic acid bacteria[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
- [19] 钟华晨. 高产生物膜乳酸菌的筛选, 鉴定及胞外多糖分泌条件的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2019.
- ZHONG H C. Screening and identification of LAB with high biofilm production and study on the secretion conditions of EPS[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2019.
- [20] 纪亚楠. 环境胁迫对乳酸菌产生物膜、信号分子 AI-2 及胞外多糖的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- JI Y N. The effects of environmental stress on the production of biofilm, signaling molecule AI-2 and EPS in lactic acid bacteria[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.
- [21] JIANG T Y, LI M Y. Quorum sensing inhibitors: A patent review [J]. Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2013, 23(7): 867-894.
- [22] SEPAHI E, TARIGHI S, AHMADI F S, et al. Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by two herbal essential oils from apiaceae family[J]. Journal of Microbiology, 2015, 53(2): 176-180.
- [23] ZHU J L, HUANG X Z, ZHANG F, et al. Inhibition of quorum sensing, biofilm, and spoilage potential in *Shewanella baltica* by green tea polyphenols[J]. Journal of Microbiology, 2015, 53(12): 829-836.
- [24] LEE H J, KIM S C, KIM J, et al. Synergistic inhibition of *Streptococcal* biofilm by ribose and xylitol [J]. Archives of Oral Biology, 2015, 60(2): 304-312.
- [25] 翟有朋. 群体感应抑制剂对海洋生态功能菌生物膜形成的影响[D]. 扬州: 扬州大学, 2013.
- ZHAI Y P. Effect of quorum sensing inhibitor on biofilm formation of marine ecological function bacteria[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2013.
- [26] 刘蕾, 桂萌, 武瑞赞, 等. LuxS/AI-2 型群体感应系统调控细菌生物被膜形成研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(19): 254-262.
- LIU L, GUI M, WU R Y, et al. Progress in research on biofilm formation regulated by LuxS/AI-2 quorum sensing[J]. Food Science, 2016, 37(19): 254-262.
- [27] 吴雅茜, 刘颖, 张瀛, 等. 4-羟基-2,5-二甲基-3(2H) 呋喃酮对单增李斯特菌 AI-2 类群体感应的干扰效应[J]. 食品工业科技, 2018, 39(22): 87-92.
- WU Y Q, LIU Y, ZHANG Y, et al. Interference effect of 4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3 (2H) furanone on AI-2 quorum-sensing of *Listeria monocytogenes* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(22): 87-92.
- [28] RYU E J, SIM J, SIM J, et al. D-Galactose as an autoinducer 2 inhibitor to control the biofilm formation of periodonto pathogens[J]. Journal of Microbiology, 2016, 54(9): 632-637.
- [29] LIU L, WU R Y, ZHANG J L, et al. D-Ribose interferes with quorum sensing to inhibit biofilm formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1860.
- [30] 杨维, 唐标, 戴贤君. 溴化呋喃酮对单增李斯特菌生物膜形成及黏附作用的影响[J]. 中国食品学报, 2019, 19(2): 55-61.
- YANG W, TANG B, DAI X J, et al. Effect of brominated 2 (5H)-furanones on biofilm formation and adhesion to cells for *L. monocytogenes* [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(2): 55-61

Effects of Quorum Sensing Inhibitors on Biofilm Formation of *Lactobacillus fermentum*

Zheng Yanxue, Zhang Yue, Wang Yan, Nie Lili, Qiao Ruifang, He Yinfeng*

(College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

Abstract In this study, two strains of *Lactobacillus fermentum* with high signaling molecule AI-2 were selected as the research objects. *D*-Galactose, *D*-ribose and furanone were selected as quorum sensing inhibitors. The AI-2 activity and biofilm formation of the two strains were determined by chemiluminescence method and crystal violet staining method. The results showed that the three inhibitors could inhibit the activity of the signal molecule AI-2 of the two strains of *Lactobacillus fermentum*. The 200 $\mu\text{mol/L}$ *D*-ribose had the best inhibitory effect on the activity of AI-2 of strain 2-1, with the inhibitory rate of 19.65%, and 50 $\mu\text{mol/L}$ *D*-ribose had the best inhibitory effect on the activity of AI-2 of strain 211, the inhibition rate was 28.57%. At the same time, different concentrations of inhibitors had certain inhibitory effect on the biofilm formation of the two strains of *Lactobacillus fermentum*, but had no significant effect on their growth. The results of scanning electron microscopy showed that the addition of *D*-ribose had no significant effect on the morphology of the two strains of *Lactobacillus fermentum* under the biofilm condition, but it could reduce the adhesion of the bacteria.

Keywords quorum sensing inhibitors; *Lactobacillus fermentum*; biological membrane; signal molecule AI-2