

Nisin 与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜的协同抑制作用

朱泽康¹, 王昭¹, 聂蓉¹, 刘国荣^{1,2,3*}

¹北京工商大学食品与健康学院 北京 100048

²北京工商大学老年营养与健康教育部重点实验室 北京 100048

³北京工商大学北京市食品添加剂工程技术研究中心 北京 100048

摘要 目的:铜绿假单胞菌生物被膜(BF)难以清除,是引起食品持续性污染的重要原因。Nisin 作为一种天然食品防腐剂可抑制多种食源性致病菌,然而其对革兰氏阴性菌效果差。通过 Nisin 与和厚朴酚联用来增强对铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜的抑制和清除能力,并探究其作用机制。方法:首先,筛选可抑制铜绿假单胞菌 BF 的中药成分及最小抑制浓度;然后评估 Nisin 与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜的协同抑制作用及其效果随时间的变化,以及对 BF 结构、组成成分、相关基因表达的影响。结果:和厚朴酚对铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜的抑制效果最强,选择其作为与 Nisin 联用的中药成分。Nisin 与和厚朴酚的 MBIC₅₀ 分别为 1 mg/mL 和 12.5 μg/mL。多个组合均有协同抑制作用,其中 1.5625 μg/mL 和厚朴酚与 0.125 mg/mL Nisin 对 BF 的协同抑制效果最佳,在 18 h 达到最高,并且二者联用显著影响 BF 结构,降低胞外多糖和 eDNA 的含量,同时 BF 相关基因 *lasR*、*pelA*、*algC*、*pqsA*、*lasI* 的表达量降低。结论:Nisin 与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌 ATCC9027 生物被膜具有协同抑制作用,其可降低 BF 相关基因转录水平以减少 EPS 和 eDNA 的分泌,从而抑制和清除 BF。本研究旨在为减少由铜绿假单胞菌生物被膜引起的食品安全问题提供解决策略。

关键词 生物被膜; 铜绿假单胞菌; 乳酸链球菌素; 和厚朴酚; 协同; 抑制

文章编号 1009-7848(2023)10-0012-11 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.10.002

世界卫生组织统计全球每年有 6 亿人感染食源性疾病,大多数病例是食用受致病性微生物污染的食品导致^[1]。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种常见的可引发呕吐、腹泻等食物中毒不良症状的食源性革兰氏阴性致病菌,在医院感染获得性食源性致病菌病的病例中,铜绿假单胞菌所引起的占比为 10%左右^[2]。它常见于腐败的水产品、肉类及凉拌即食产品等,如蔬菜沙拉、鱼罐头等^[3-4]。

生物被膜(Biofilm, BF)是指细菌黏附于接触表面,分泌多种胞外基质互相黏结、围绕自身而形成的具有某些特定功能或结构的膜。BF 的存在能提高铜绿假单胞菌在各种环境中定植能力及耐药性,其耐药性比浮游态细菌高出 10~1 000 倍^[5]。BF 对细菌有保护作用,不仅可以阻止抗生素等药物

发挥作用,还可以帮助逃脱免疫吞噬细胞,导致其难以清除^[6]。同时,铜绿假单胞菌的生物被膜对多种物理手段,如高温高压、消毒剂、紫外线照射等具有较强的抵抗力,从而提升了食品中感染铜绿假单胞菌的几率与治理难度^[7]。因此,有必要寻找某些药物来有效抑制铜绿假单胞菌 BF 的生成。

乳酸链球菌素(Nisin)是乳酸链球菌所分泌的具有抑菌作用的多肽,Nisin 是被 FDA/WHO 认证并允许用作食品添加剂且商业化的细菌素,它具有高效抑菌性、高安全性、无残留等特性,能有效抑制或杀死革兰氏阳性菌(Gram-positive bacteria, G⁺)^[8]。然而, G⁺与革兰氏阴性菌(Gram-negative bacteria, G⁻)的细胞壁结构不同,Nisin 对于 G⁻一般无抑制效果,因铜绿假单胞菌的 BF 存在,故可将 Nisin 阻挡在胞外,仅对铜绿假单胞菌起很少的作用^[9]。此外,Nisin 的生产成本高,不利于在食品工业中大规模使用。研究表明,通过改变作用时的 pH、温度或者联合其它物质能够有效增加 G⁻对 Nisin 的敏感性,以及降低 Nisin 的使用量^[10-11]。有人发现某些中药成分对铜绿假单胞菌的 BF 有一定的抑制作用,如董满园等^[12]发现 150 μmol/mL 和

收稿日期: 2022-10-14

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目(2022A1515140021); 国家自然科学基金面上项目(31871772)

第一作者: 朱泽康,男,硕士生

通信作者: 刘国荣 E-mail: liuguorong@th.btbu.edu.cn

厚朴酚对铜绿假单胞菌 PAO1 有抑制作用。谢林利等^[13]发现 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄芩素可以显著抑制铜绿假单胞菌 X140 的黏附性和抑制生物膜的形成。程慧娟等^[14]发现 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 穿心莲内酯对铜绿假单胞菌 PAO1 的生物被膜有抑制作用。

本研究筛选与 Nisin 联合的中药成分(和厚朴分、穿心莲内酯、黄芩素),评估 Nisin 与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜的协同抑制作用及效果。采用扫描电镜 (Scanning electron microscope, SEM) 观察铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜的结构变化。通过测定其对铜绿假单胞菌生物被膜的组成成分及相关基因表达的影响,探讨和厚朴酚对铜绿假单胞菌生物被膜的抑制机制。旨在减少由铜绿假单胞菌生物被膜引起的食品安全问题,同时为增强 G-对 Nisin 的敏感性和降低防腐剂使用剂量提供参考依据,为开发新型天然防腐剂提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 试验菌株 铜绿假单胞菌 9027 购于美国标准菌种保藏库(ATCC)。

1.1.2 试验试剂 1%结晶紫染液、乳酸链球菌素、XTT 钠盐、和厚朴酚、黄芩素、穿心莲内酯,塞纳生物科技有限公司;LB 肉汤培养基,北京奥博星生物技术有限责任公司;2.5%戊二醛,雷根生物技术有限责任公司;甲萘醌,梯希爱化成工业有限公司;RNA 提取试剂盒、(SYBR Green) 荧光定量预混试剂,天根生物科技有限公司。

1.2 仪器及设备

SpectraMax i3 酶标仪,美谷分子仪器上海有限公司;SU8010 场发射扫描电子显微镜、E-1010 离子溅射仪,日立高新技术有限公司;实时荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 可抑制铜绿假单胞菌生物被膜的物质筛选

采用结晶紫染色法,测定各中药成分对铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜形成的抑制效果;将菌悬液(2×10^7 CFU/mL),取 100 μL 至 96 孔板中,孔中分别再加入 100 μL Nisin、穿心莲内酯、黄芩素、和厚朴酚,使最终质量浓度分别为 1 000, 200,

40, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加入 PBS 作对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 弃上清液, 200 μL PBS 轻柔清洗 3 次; 用甲醇固定 10 min 后去除残液, 用 0.1% 结晶紫染色 30 min, 再用 PBS 冲洗; 加入 0.1% 乙酸和 95% 乙醇溶液各 100 μL 后, 用酶标仪测定 595 nm 波长下的吸光值; 设置 3 个重复, 取平均值。

1.3.2 Nisin、和厚朴酚单独处理对铜绿假单胞菌生物被膜最小抑制浓度的测定 采用二倍稀释法和 XTT 还原法测定和厚朴酚和 Nisin 的 MBIC₅₀; 在 96 孔板中, 分别加入 100 μL (2×10^7 CFU/mL) 菌悬液, 再加入 100 μL 最终质量浓度分别为 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/mL Nisin, 或加入 100 μL 最终质量浓度分别为 400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和厚朴酚, 对照组为等量菌液、PBS, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。吸去 96 孔板中菌液, 用 PBS 清洗 2 遍, 在每个孔内加入 158 μL 20 g/L 葡萄糖的 PBS 缓冲液, 40 μL XTT 和 2 μL 甲萘醌。铝箔覆盖 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 3 h, 转移至新 96 孔板中, 测定 492 nm 下的吸光值。设置 3 个重复, 取平均值。抑制率超过 50% 时所需的最小药物浓度作为最低抑制生物被膜浓度 (MBIC₅₀)。通过酶标仪测定生物被膜态菌液与对照组的吸光度, 从而获得生物被膜抑制率。

1.3.3 Nisin 与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜的协同作用评估 通过棋盘法 (微量稀释法) 检测 Nisin 与和厚朴酚的联合用药效果。96 孔板中每孔加入 100 μL 菌悬液 (2×10^7 CFU/mL), 在每孔中同时加入 Nisin 与和厚朴酚各 50 μL , 其中 Nisin 与和厚朴酚的浓度从 1 倍 MBIC₅₀ 值到 1/32 倍 MBIC₅₀ 值依次减少。以和厚朴酚、Nisin 单独作用组和 PBS 为对照, 重复 3 次。用分级抑菌浓度指数 (FICI) 来判断 Nisin 与和厚朴酚的相互作用, 计算公式如下:

$$\text{FICI} = \text{FICI}_A + \text{FICI}_B = \frac{\text{A 药联合时 MBIC}}{\text{A 药单独时 MBIC}} + \frac{\text{B 药联合时 MBIC}}{\text{B 药单独时 MBIC}}$$

1.3.4 Nisin 与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜的抑制效果分析

1.3.4.1 对生物被膜形成的抑制效果分析 在 96 孔板中加入 100 μL 2×10^7 CFU/mL 的菌液和 100 μL 不同浓度药物, 对照组为加入 100 μL PBS, 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别培养 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 h, 参照 1.3.2 节

的方法,测定细菌生物被膜的抑制率。

1.3.4.2 对成熟生物被膜的清除效果分析 在96孔板中加入100 μL 2×10^7 CFU/mL的菌液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后,弃上层浮游菌液,无菌PBS清洗2次,加入100 μL LB培养基和100 μL 药物,加入200 μL LB培养基作对照。然后37 $^{\circ}\text{C}$ 分别培养3,6,9,12,18,24,36 h,参照1.3.2节的方法测定细菌生物被膜的清除率。

1.3.5 Nisin与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜结构的影响 将菌液稀释至 2×10^7 CFU/mL,取1 mL接种到12孔板中,孔板中提前加入圆形盖玻片,加入1 mL不同药物,以PBS为对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后弃上清,用PBS清洗2遍,加入1 mL 2.5%戊二醛溶液固定8 h以上。弃废液,以去离子水清洗菌体,重复3次后,依次用50%,70%,85%,95%的酒精脱水,每个梯度静置13 min。用无水乙醇脱水14 min,脱水3次,后冷冻干燥1 d,取出干燥完全的样品、阴极喷涂将样品金覆盖,观察铜绿假单胞菌 ATCC 9027 形态与结构并拍照。

1.3.6 Nisin与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜组成成分的影响

1.3.6.1 对EPS合成的影响 采用苯酚-硫酸法测定铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜中可溶性多糖与不可溶性多糖含量。BF的培养和处理方法参考1.3.4.1和1.3.4.2节的步骤,将BF吸取至离心管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下8 000 r/min离心30 min后,取200 μL 上清液与200 μL 6%苯酚溶液、0.5 mL浓硫酸混合,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴15 min,后测定490 nm波长

处吸光值,为可溶性多糖含量。而离心后的沉淀重悬于0.9%的生理盐水(含0.22%的甲醛)中,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下12 000 r/min离心30 min取上清测定不可溶性多糖含量,方法同上。

1.3.6.2 对eDNA分泌量的影响 取1 mL菌悬液加入到12孔板中,再分别加入1 mL不同组分药物,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h;按Drisse等^[7]的方法提取eDNA,用分光光度计检测浓度,为抑制作用下的eDNA含量。试验重复3次。

取1 mL菌悬液加入到12孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后弃上层浮游菌液,并用PBS清洗2次,后加入1 mL TSB培养基和1 mL药物,以PBS作对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养18 h后测定清除作用下的eDNA含量,方法同上。

1.3.7 Nisin与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜合成相关基因表达的影响 采用Primer 6软件设计生物被膜相关基因*lasR*、*pqsA*、*pelA*、*algC*、*lasI*上下游引物。

生物被膜的培养和处理方法同上,取菌悬液6 mL,参考RNA提取试剂盒说明书提取总RNA,采用一步法反转录合成cDNA,最后q-PCR扩增,以*rpoD*为内参基因。试验重复3次。

RT-qPCR反应体系(20 μL):SYBR Green1 2 \times SuperRealPreMix Plus 10 μL ;DNase/RNase-Free Water 6.8 μL ;上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各0.6 μL ;cDNA 2 μL 。RT-qPCR反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min;98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40个循环。

表1 荧光定量PCR引物列表

Table 1 List of primers for fluorescent quantitative PCR

基因	序列(5' \rightarrow 3')	温度/ $^{\circ}\text{C}$
<i>lasR</i> -F	ACGCTCAAGTGGAAAATTGG	53.35
<i>lasR</i> -R	GTAGATGGACGGTTCCCAGA	57.45
<i>pqsA</i> -F	CAACCTGACCGAGGTTCTGT	57.45
<i>pqsA</i> -R	TGGCCTGGGAGAGAATGTAG	57.45
<i>algC</i> -F	CTACTTCAAGCAGATCCGC	58.00
<i>algC</i> -R	AGGTCCTTCAGGTTCTCC	56.00
<i>pelA</i> -F	CCTTCAGCCATCCGTTCTTCT	57.80
<i>pelA</i> -R	TCGCGTACGAAAGTCGACCTT	57.45
<i>lasI</i> -F	CGTGCTCAAGTGTTCAAGGA	55.40
<i>lasI</i> -R	AAAACCTGGGCTTCAGGAGT	55.40
<i>rpoD</i> -F	CTGATCCAGGAAGGCAACAT	55.40
<i>rpoD</i> -R	TGAGCTTGTTGATCGTCTCG	55.40

2 结果与分析

2.1 最佳中药成分的筛选

筛选对铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜有最佳抑制效果的中药成分。由图 1 可知, Nisin 对铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜的抑制率为 39%, 有较好的抑制效果; 而和厚朴酚、穿心莲内酯、黄芩素的抑制率分别为 29.6%, 15.1%, 3%, 其中和厚朴酚对铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜抑制效果最好; 因此, 选取和厚朴酚作为与 Nisin 联合的中药成分。

2.2 Nisin、和厚朴酚对铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜的 MBIC₅₀

由表 2 可知, 1 mg/mL Nisin 对铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜的抑制率为 50.7%, 随着 Nisin 浓度的减少, 抑制率也逐渐降低, 当 Nisin 质量浓度大于 1 mg/mL 时, 抑制率的增幅并不明显。和厚朴酚仅在 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 便能达到 52.0% 抑制率, 与 Nisin 作用效果相似, 其抑制率随着和厚朴酚的含量增加而增加, 然而超过 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后抑

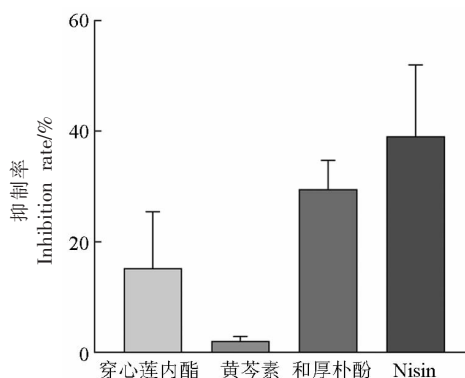


图 1 中药成分单独作用下铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜的抑制率

Fig.1 Inhibition rate of *P. aeruginosa* ATCC 9027 biofilm under the action of Chinese herbal ingredients alone

制率的增幅不大。因此, Nisin、和厚朴酚对铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜的 MBIC₅₀ 分别为 1 mg/mL 和 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 2 Nisin 与和厚朴酚单独作用对菌株 BF 的抑制率

Table 2 Inhibition of the biofilm of the strain by Nisin with honokiol alone

Nisin 质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	抑制率/%	和厚朴酚质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	抑制率/%
4	54.5 \pm 1.7	400	73.7 \pm 0.4
2	51.6 \pm 1.1	200	72.7 \pm 0.2
1	50.7 \pm 4.7	100	70.1 \pm 0.1
0.5	37.8 \pm 6.4	50	69.1 \pm 0.1
0.25	29.3 \pm 1.8	25	62.5 \pm 0.6
0.125	18.4 \pm 2.2	12.5	52.0 \pm 7.6
0.0625	6.5 \pm 3.3	6.25	43.2 \pm 8.0
0	-	0	-

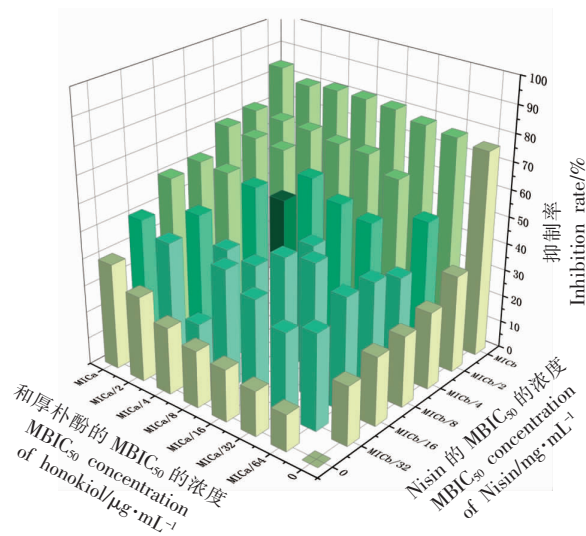
注: 抑制率(%) = $(\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{S95nm}}) / \text{OD}_{\text{对照}} \times 100$ 。

2.3 Nisin 与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜的协同作用评估

由图 2 可知, 存在 8 个组合能够使铜绿假单胞菌 ATCC 9027 的 BF 抑制率在 50% 左右。FICI 值结果见表 3, 发现有 5 个组合的 FICI 值在 0.250~0.500 之间, 表明联合处理对铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜有协同抑制作用, 其中当 0.125 mg/mL Nisin 与 1.5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和厚朴酚联用时, 协同抑制效果最佳, 然而也存在无关和相加作用的组合。

2.4 Nisin 与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜的抑制效果分析

2.4.1 生物被膜抑制率时间变化曲线 如图 3 所示, Nisin 与和厚朴酚联用、和厚朴酚单独处理的抑制率随着时间的延长而增加, 18 h 时达到顶峰, 抑制率分别为 77.1%, 70.9%, 然后开始缓慢下降。而 Nisin 的抑制率在 12 h 达到最大, 为 48.3%, 并且此后抑制率大幅度下降, 是因为 BF 在生长初期对 Nisin 的抵抗力较低, 后期因为 Nisin 对 G-菌的作用效果差而无法抑制 BF 的生长。



注:MBICa为和厚朴酚的MBIC₅₀的浓度,MBICb为Nisin的MBIC₅₀的浓度;黄色部分为单独作用对照组。

图2 Nisin与和厚朴酚联合对铜绿假单胞菌ATCC 9027生物被膜的抑制率

Fig.2 Inhibition rate of biofilm of *P. aeruginosa* ATCC 9027 by Nisin in combination with honokiol

2.4.2 生物被膜清除率时间变化曲线 由图4可知,和厚朴酚、药物联用对BF的清除率随时间延长缓慢上升,在18h时达到最大,分别为25.1%和51.5%,药物联用表现出更好的清除效果。然而在18~24h,清除率剧烈下降,这可能是由于药物被

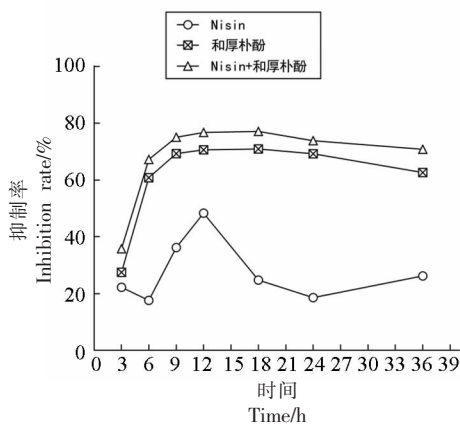


图3 4种处理下铜绿假单胞菌ATCC 9027的生物被膜抑制率时间变化曲线

Fig.3 Time variation curves of biofilm inhibition rate of *P. aeruginosa* ATCC 9027 under four treatments

表3 不同浓度组合下的Nisin与和厚朴酚联合作用的FICI值

Table 3 FICI values of Nisin in combination with honokiol at different concentration combinations

Nisin 质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	和厚朴酚 量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	FICI 值	作用
1/32	25/2	1.03125	无关
1/16	25/4	0.5625	相加
1/8	25/8	0.375	协同
1/8	25/16	0.25	协同
1/4	25/16	0.375	协同
1/4	25/32	0.3125	协同
1/4	25/64	0.28125	协同
1/2	25/128	0.515625	相加

注:FICI<0.5,为协同作用;FICI=0.5~1,为相加作用;FICI=1~2,为无关作用;FICI>2,为拮抗作用。

消耗导致其清除效果变差;Nisin单独处理的清除效果差,而一直缓慢上升,也许是由于Nisin难以穿透G-菌的BF,需要更长的作用时间才能达到与联用处理同等的清除效果。

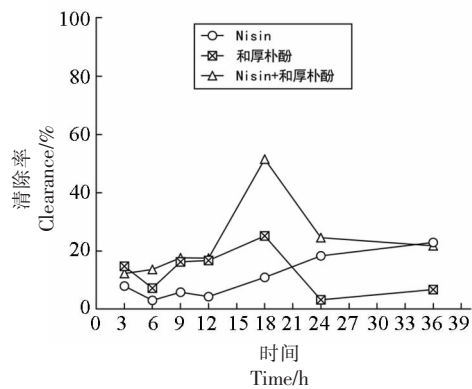


图4 4种处理下铜绿假单胞菌ATCC 9027的生物被膜清除率时间变化曲线

Fig.4 Time variation of biofilm clearance rate of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 under four treatments

2.5 Nisin 与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜结构的影响

SEM 扫描电镜结果如图 5 所示, 空白对照形成较为稳定的生物被膜, 菌体以多层堆叠形式聚集, 外层有大量包裹物, 呈现出明显的立体三维结构 (图 5d); Nisin 单独处理只有极少黏附菌落, 大部分菌落都互不黏附 (图 5a); 和厚朴酚单独处理下绝大部分菌体呈杆状分布, 表面有少量丝状物

质出现 (图 5b)。而在联合作用下, 生物被膜稀疏, 大多数细菌都以单体、散体形式存在, 只有极少数的细菌还在黏附载体上, 菌体周边较为清晰, 几乎无生物被膜 (图 5c)。进一步验证了 Nisin 与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜形成的协同抑制作用, 同时药物影响了胞外聚合物的形成, 间接影响了生物被膜, 因此有必要进一步研究药物对生物被膜态菌的作用机理。

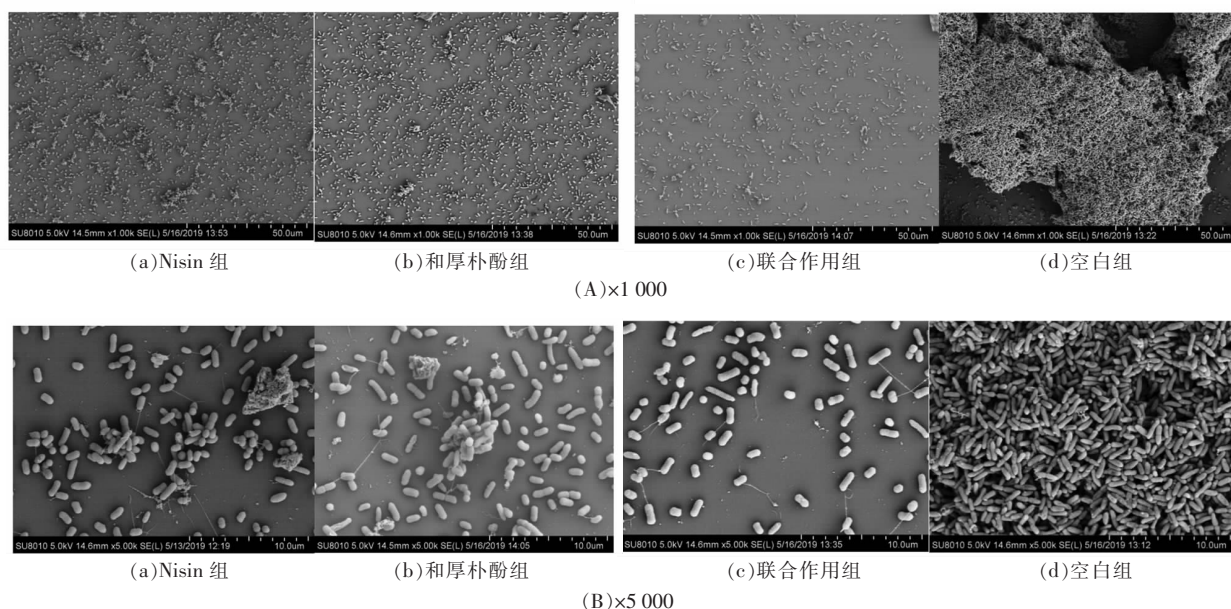


图 5 Nisin 与和厚朴酚协同抑制铜绿假单胞菌 ATCC 9027 的扫描电镜图片
Fig.5 Scanning electron microscope images of Nisin in combination with honokiol to inhibit *P. aeruginosa* ATCC 9027

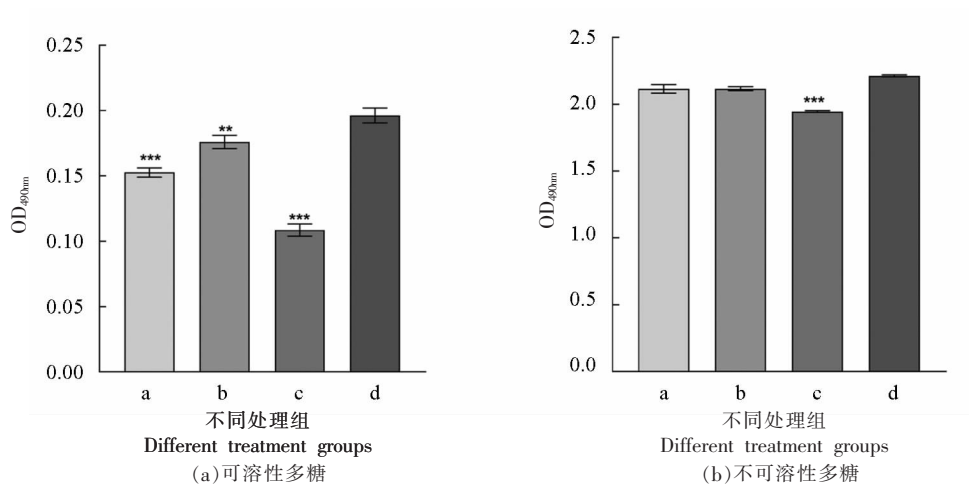
2.6 Nisin 与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜组成成分的影响

2.6.1 对 EPS 含量的分析 EPS 是 BF 至关重要的成分之一, 由图 6 可知, Nisin、和厚朴酚、药物联用组对可溶性多糖抑制率分别为 22.4%, 10.2%, 44.8%, 对不可溶性多糖的抑制率分别为 4.4%, 4.3%, 12.0%。结果表明, Nisin 与和厚朴酚单用和联用均有效降低了铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜可溶性多糖含量, 而对不溶性多糖的影响较少。此外, 药物联用组比单用组表现出更好的抑制效果。

在清除作用中也有类似的结果, 由图 7 可知, Nisin、和厚朴酚、药物联用组对可溶性多糖的清除

率分别为 35.2%, 21.9%, 43.8%, 对不可溶性多糖的清除率分别为 3.5%, 4.5%, 10.2%。无论是抑制还是清除作用下, 和厚朴酚对可溶性多糖的影响较低。

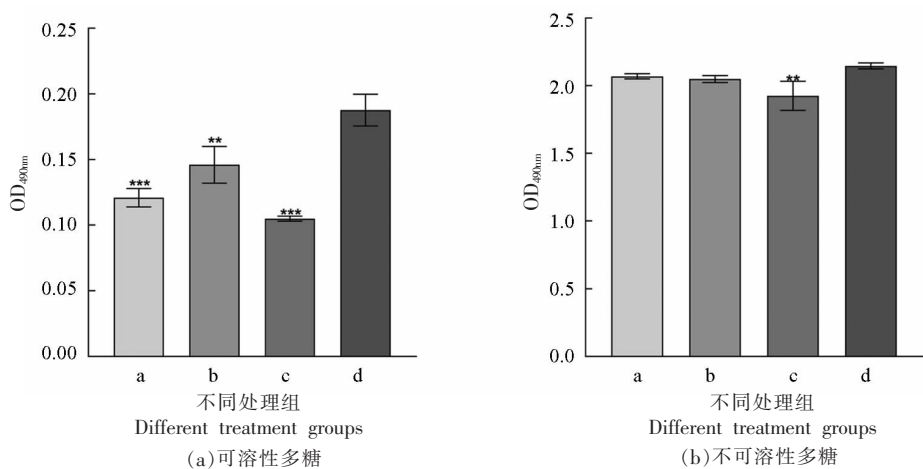
2.6.2 对 eDNA 含量的分析 如图 8a 所示, 不同处理均可抑制 eDNA 的分泌。Nisin、和厚朴酚、药物联用组的抑制率分别为 26.7%, 81.8%, 86.1%, 其中和厚朴酚和药物联用组对 eDNA 的抑制更高。如图 8b 所示, Nisin、和厚朴酚、药物联用对 eDNA 的清除率分别为 33%, 40.5%, 60.3%, 药物联用对 eDNA 合成的影响最大这与其有最佳抑制与清除效果的结果一致。相对于清除作用对 eDNA 的影响, 和厚朴酚抑制作用效果更好。



注:a. Nisin 单用组;b. 和厚朴酚单用组;c. Nisin 与和厚朴酚联用组;d. 空白组;与空白对照组相比较,**. $P<0.01$,***. $P<0.001$ 。

图6 抑制作用下铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜的可溶性多糖(a)与不可溶性多糖(b)含量

Fig.6 Soluble polysaccharide (a) and insoluble polysaccharide (b) contents of the biofilm of *P. aeruginosa* ATCC 9027 under inhibition



注:a. Nisin 单用组;b. 和厚朴酚单用组;c. Nisin 与和厚朴酚联用组;d. 空白组;与空白对照组相比较,**. $P<0.01$,***. $P<0.001$ 。

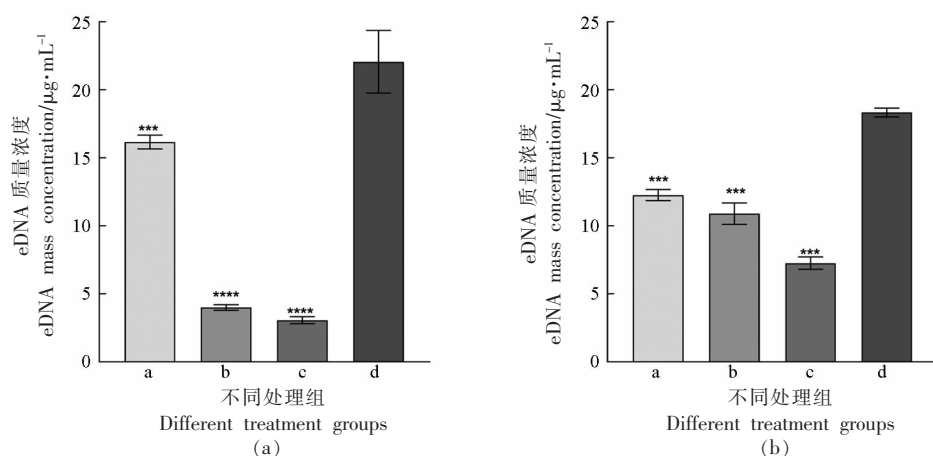
图7 清除作用下铜绿假单胞菌 ATCC 9027 生物被膜的可溶性多糖(a)与不可溶性多糖(b)含量

Fig.7 Soluble polysaccharide (a) and insoluble polysaccharide (b) contents of the biofilm of *P. aeruginosa* ATCC 9027 under the effect of scavenging

2.7 Nisin 与和厚朴酚联用对铜绿假单胞菌生物被膜合成相关基因表达的影响

由图9可知,在Nisin、和厚朴酚以及二者联用发挥抑制和清除BF效果时,*lasR*、*pelA*、*lasI*、*pqsA*与*algC*基因都出现明显下调,药物联合组比单药组的效果更为明显。在抑制BF形成时,药物处理对BF合成相关基因表达量的影响程度为:药物联合组>Nisin>和厚朴酚,这与其对BF的抑制程度类似。其中,在和厚朴酚单独处理中,控制Pel

多糖形成的*pelA*基因仅下调了38.1%,表明单独使用和厚朴酚对EPS的影响较少,这与EPS的分泌量一致。当清除BF时,药物处理对BF合成相关基因表达量的影响程度为:药物联合组>和厚朴酚>Nisin,同样与清除效果的趋势相同;Nisin处理对*pelA*、*lasI*、*pqsA*与*algC*基因的抑制效果弱,这是因为Nisin难以进入成熟BF而导致其清除效果差。然而,无论是在单独处理还是在联合使用中,*lasR*基因都显著下调,这表明两种药物都能显



注:a. Nisin 单用组;b. 和厚朴酚单用组;c. Nisin 与和厚朴酚联用组;d. 空白组;与空白对照组相比较,***. $P < 0.001$; ****. $P < 0.0001$.

图 8 药物表现抑制作用(a)与清除作用(b)时 eDNA 的含量

Fig.8 The amount of eDNA when the drug exhibits inhibition (a) versus clearance (b)

著影响 Psl 多糖的形成。在抑制 BF 时,相对 Nisin 组,和厚朴酚处理下的影响 eDNA 分泌的 *pqsA* 下调程度低,然而和厚朴酚组中对 eDNA 的抑制效

果强于 Nisin 组,与基因表达结果相反,这是因为有多个基因调控 eDNA 的分泌,可能和厚朴酚在其它位点强烈抑制 eDNA 的合成。

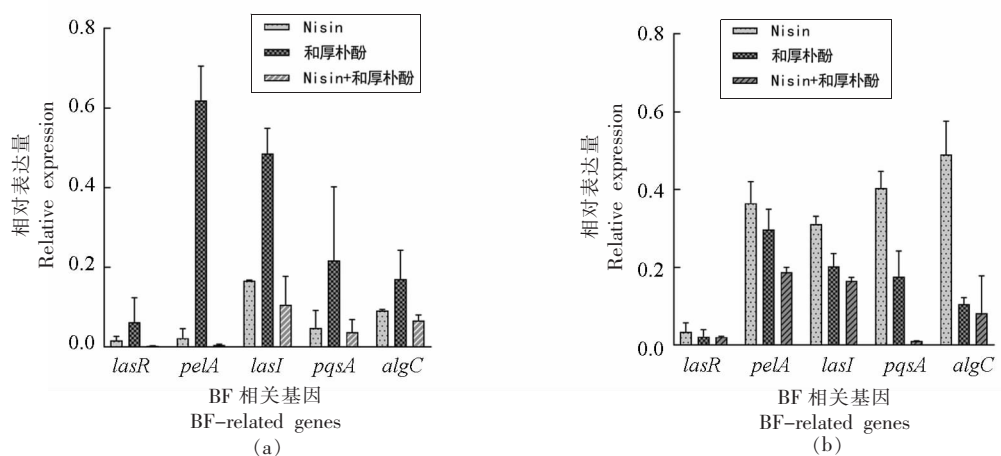


图 9 不同处理后表现抑制作用(a)与清除作用(b)时对 BF 相关基因转录水平的影响

Fig.9 Effect on transcript levels of biofilm-associated genes after different treatments showing repression (a) and clearance (b)

3 讨论与结论

3.1 讨论

生物被膜对细菌有保护作用并且可增强其耐药性,而且在食品设备中难以清除,是重大的食品安全隐患。为减少铜绿假单胞菌生物被膜的危害,首先分析 3 种中药成分对铜绿假单胞菌生物被膜的抑制效果,发现和厚朴酚抑制作用最强;然后,通过棋盘法筛选出 Nisin 与和厚朴酚联用的最佳

组合:1.5625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和厚朴酚与 0.125 mg/mL Nisin;SEM 结果表明,不同处理组下 BF 的形态有明显区别,其中在药物联合下,大多数细菌为零散形式存在,零散的单个杆菌上几乎没有生物被膜。一方面可能是因为黏附介质,如可溶性多糖与不可溶性多糖分泌量降低^[15],另一方面可能是由参与 BF 基质构成和推动 BF 扩张运动的 eDNA 减少而造成^[16]。

构成BF的主要成分为胞外多糖、多肽、胞外蛋白及胞外DNA等。其中EPS是BF最重要的成分之一,它能影响铜绿假单胞菌之间的黏附性,是初始黏附时期BF发展的支架,不仅作为影响BF形成的信号分子,还能作为抵抗免疫和抗生素攻击的屏障^[17]。eDNA也是BF的重要组成,在BF的发展、作为连接介质具有重要作用,且在维持和稳定成熟BF的结构中也具有重要作用^[18]。本研究发现,Nisin与和厚朴酚联用能有效对EPS和eDNA产生抑制和清除,从而影响BF的存在。

为探讨Nisin与和厚朴酚联用抑制铜绿假单胞菌ATCC 9027生物被膜的可能机制,利用RT-qPCR分析BF相关调控基因的表达。EPS一般为3种多糖构成: Pel、Psl及藻酸盐,其中Psl多糖对BF的建立、抵抗抗生素具有重要作用,在成熟阶段还能促进细菌运动,研究发现*lasR*能与*psl*操纵子的启动子区域相结合,能间接控制Psl多糖的合成^[19]。Pel多糖可对形成牢固的BF发挥重要作用,可作为黏附因子帮助其在介质表面黏附,研究表明*pelA*与Pel多糖的形成有关^[20]。藻酸盐对于BF结构的稳定性和防护作用至关重要,能够维持BF所必需的水分和营养,还被证明能减少免疫细胞及抗生素对BF的攻击,研究表明*algC*参与藻酸盐前体合成,能够间接影响藻酸盐的形成^[21]。本研究表明,在药物对BF表现抑制与清除作用时,*lasR*、*pelA*与*algC*的基因表达量下调,药物联用组尤其显著,表明当药物对BF产生抑制或清除作用时,可能是通过减少Psl多糖、Pel多糖及藻酸盐的含量,从而影响BF。铜绿假单胞菌群体感应系统主要由*lasI/lasR*系统、*rhlI/rhlR*系统以及基于喹诺酮信号(*Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal, PQS)的群体感应系统组成^[22]。PQS系统对BF形成时细菌聚集、BF结构稳定等具有重要作用,它还可以促进eDNA的释放^[23]。有研究表明*pqsABCDE*操纵子能够编码2-庚基-4-喹诺酮(2-Heptyl-4-quinolone, HHQ),而HHQ是PQS系统的信号分子2-庚基-3-羟基-4-喹诺酮的前体物质,因此*pqsA*能够间接调控PQS系统,从而影响BF的形成^[24]。*LasR*系统能够调控胞外酶、外毒素A及BF的形成,研究发现*lasI*能够编码信号分子——*N*-(3-氧代十二烷酰基)-*L*-高丝氨酸内^[25],它是铜绿假单胞菌生物被膜形成所必需的,它能与*LasR*相结合,从而影响BF的生成和分散^[26]。本研究表明,当药物对BF表现抑制与清除作用时,药物联用组中*pqsA*与*lasI*的基因表达量下调更为显著,因此推测药物是通过下调*pqsA*与*lasI*的表达量,间接调控PQS系统及*LasR*系统,从而影响eDNA及BF的形成。因此,Nisin与和厚朴酚协同抑制铜绿假单胞菌ATCC 9027BF和清除BF的作用机制与*lasR*、*pelA*、*algC*、*pqsA*、*lasI*相关。

3.2 结论

综上所述,Nisin与和厚朴酚联合使用的多个组合均对铜绿假单胞菌ATCC 9027生物被膜具有协同抑制作用,其中1.5625 μg/mL和厚朴酚与0.125 mg/mL Nisin组合的抑制效果最好。对生物被膜的抑制率和清除率先增加,在18 h时达到最大值,然后逐渐降低。其主要作用机制是通过降低*lasR*、*pelA*、*lasI*、*pqsA*与*algC*基因的表达,减少EPS的生成及eDNA的分泌,从而抑制铜绿假单胞菌ATCC 9027生物被膜的形成和清除成熟生物被膜。然而Nisin与和厚朴酚是通过何种方式影响相关基因的表达尚不清楚,需进一步研究。生物被膜的形成是复杂且由多种机制调控的过程,本课题组下一步将寻找Nisin与和厚朴酚抑制和清除生物被膜的其它潜在作用机制。

参 考 文 献

- [1] 崔方超,李学鹏,励建荣. 碳基纳米材料及其在食源性致病菌生物膜预防和清除中的应用研究[J]. 未来食品科学, 2021, 1(3): 11-27.
CUI F C, LI X P, LI J R. Carbon-based nanomaterials and their applications in the prevention and eradication of biofilm in food-borne pathogenic[J]. Future Food Science, 2021, 1(3): 11-27.
- [2] DUNDAR D, OTKUN M. *In-vitro* efficacy of synergistic antibiotic combinations in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains[J]. Yonsei Medical Journal, 2010, 51(1): 111-116.
- [3] 蔡双福,张琴,黄耀雄. 食品中铜绿假单胞菌的监测分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(6): 875-876.
CAI S F, ZHANG Q, HUANG Y X. Monitoring and analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in food[J].

- Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2015, 25(6): 875-876.
- [4] WRIGHT C, KOMINOS S D, YEE R B. Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads[J]. Appl Environ Microbiol, 1976, 31(3): 453-454.
- [5] 伍勇, 陈丽华. 重视细菌生物被膜导致的细菌耐药及其解决方案[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(10): 725-727.
- WU Y, CHEN L H. Attention to the antibiotic resistance caused by bacterial biofilm and its solutions[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2014, 37(10): 725-727.
- [6] KOSURU R Y, AMRITA R, SOUMEN B. Antagonistic roles of gallates and ascorbic acid in pyromelanin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Current Microbiology, 2021, 78(11): 3843-3852.
- [7] VAN DRISSE C M, ROSALIE L S, OLGA K, et al. Computationally designed pyocyanin demethylase acts synergistically with tobramycin to kill recalcitrant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences-PNAS, 2021, 118(12): 1.
- [8] 刘静, 杨富民, 白斌芳, 等. 产细菌素乳酸菌菌株的来源及所产细菌素的分类研究进展[J]. 中国酿造, 2018, 37(6): 20-24.
- LIU J, YANG F M, BAI B F, et al. Research progress on the source of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and classification of bacteriocin[J]. China Brewing, 2018, 37(6): 20-24.
- [9] ARQUÉS J L, EVA R, MANUEL N, et al. Inactivation of Gram-negative pathogens in refrigerated milk by reuterin in combination with nisin or the lactoperoxidase system[J]. European Food Research and Technology, 2008, 227(1): 77-82.
- [10] BOZIARIS I S, ADAMS M R. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives[J]. J Appl Microbiol, 2001, 91(4): 715-724.
- [11] LI Q, MANUEL M L, OSCAR P K. Increasing the antimicrobial activity of nisin-based lantibiotics against gram-negative pathogens[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(12): e00052-18.
- [12] 董满园, 宋阳, 郑红达, 等. 中药厚朴中群体感应抑制剂的分离与活性评价[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(5): 820-824.
- DONG M Y, SONG Y, ZHENG H D, et al. Isolation and activity evaluation of quorum-sensing inhibitors from *Magnolia officinalis* [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(5): 820-824.
- [13] 谢林利, 周密, 陈勇川, 等. 黄芩苷、黄芩素抑制铜绿假单胞菌生物膜形成的研究[J]. 中国药房, 2010, 21(39): 3651-3653.
- XIE L L, ZHOU M, CHEN Y C, et al. Study on inhibition effect of baicalin and baicalein on the formation *Pseudomonas aeruginosa* biofilm[J]. Chinese Pharmacy, 2010, 21(39): 3651-3653.
- [14] 程惠娟, 刘江, 张庚. 穿心莲内酯抗铜绿假单胞菌生物被膜及与阿奇霉素协同抗菌作用[J]. 中国微生物生态学杂志, 2012, 24(2): 120-123.
- CHENG H J, LIU J, ZHANG G. Effect of andrographolide against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and its synergistic antibacterial activity in combination with azithromycin[J]. Chinese Journal of Microecology, 2012, 24(2): 120-123.
- [15] FIELD D, NYNKE S, PAUL D C, et al. Synergistic Nisin-polymyxin combinations for the control of *Pseudomonas* biofilm formation[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: e46884.
- [16] PETERSO B W, VAN DER MEI H C, SJOLLEMA J, et al. A distinguishable role of eDNA in the viscoelastic relaxation of biofilms[J]. mBio, 2013, 4(5): e413-e497.
- [17] ANAÍS S, CARON F, ETIENNE M. Commentary: Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents-how *P. aeruginosa* can escape antibiotics[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2164.
- [18] DUY-KHIET H, DE ROSSI C, LORETZ B, et al. Itaconic acid increases the efficacy of tobramycin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Pharmaceutics, 2020, 12(8): 691.
- [19] 肖梦圆, 武瑞赞, 谭春明, 等. 群体感应系统及其抑制剂对细菌生物被膜调控的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(13): 227-234.
- XIAO M Y, WU R Y, TAN C M, et al. Recent advances in understanding the role of quorum sensing system and quorum sensing inhibitors in regulation bacterial biofilm formation[J]. Food Science, 2020, 41(13): 227-234.
- [20] COLVIN K M, NOOR A, PERRIN B, et al. PeIA

- deacetylase activity is required for pel polysaccharide synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(10): 2329–2339.
- [21] MARIAM M, SARI-S R, NATHALINE H A, et al. Natural products and polysorbates: Potential inhibitors of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Infection in Developing Countries, 2020, 14(6): 580–588.
- [22] THOMPSON L S, WEBB J S, RICE S A, et al. The alternative sigma factor RpoN regulates the quorum sensing generhII in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 220 (2): 187–195.
- [23] 王帅涛, 高倩倩, 成娟丽, 等. 铜绿假单胞菌生物被膜组成及其受体感应系统和 c-di-GMP 调控的研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(5): 1106–1122.
- WANG S T, GAO Q Q, CHENG J L, et al. Progress of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm composition and its regulation by the quorum sensing system and c-di-GMP[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(5): 1106–1122.
- [24] BARTHE C, NANDAKUMAR S, DERLICH L, et al. Exploring the expression of *Pseudomonas aeruginosa* genes directly from sputa of cystic fibrosis patients[J]. Letters in Applied Microbiology, 2015, 61(5): 423–428.
- [25] 鄂顺梅, 陈富, 龙一飞, 等. LasI/rhII 基因缺失和阿奇霉素对铜绿假单胞菌毒力基因的影响[J]. 实用医学杂志, 2018, 34(16): 2773–2776.
- E S M, CHEN F, LONG Y F, et al. The effects of lasI/rhII and azithromycin on the expression of virulence gene in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. The Journal of Practical Medicine, 2018, 34 (16): 2773–2776.
- [26] DAVIES D G, PARSEK M R, PEARSON J P, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm [J]. Science, 1998, 280(5361): 295–298.

Synergistic Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm by the Combination of Nisin and Honokiol

Zhu Zekang¹, Wang Zhao¹, Nie Rong¹, Liu Guorong^{1,2,3*}

¹School of Food and Health, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048

²Key Laboratory of Geriatric Nutrition and Health, Ministry of Education,

Beijing Technology and Business University, Beijing 100048

³Research Center of Food Additives, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048)

Abstract Objective: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm (BF) is a major cause of persistent food contamination. Nisin, a natural food preservative, can inhibit a variety of foodborne pathogens, but is ineffective against Gram-negative bacteria. In this study, it aimed to enhance the inhibition and BF scavenging ability of *P. aeruginosa* ATCC 9027 biofilm by combining Nisin with honokiol, and to investigate the related mechanism of action. Methods: Firstly, this study screened the herbal components that could inhibit *P. aeruginosa* BF and the minimum inhibitory concentrations; then this study evaluated the synergistic inhibitory effects of Nisin in combination with honokiol on the biofilm of *P. aeruginosa*, the changes of the inhibitory effects over time, and the effects on the structure, components and related gene expression of BF. Results: The strongest inhibitory effect of honokiol on the biofilm of *P. aeruginosa* ATCC 9027 was selected as the herbal component in combination with Nisin; the MBIC₅₀ of Nisin and honokiol were 1 mg/mL and 12.5 μg/mL, respectively. Several combinations showed synergistic inhibitory effects, among which 1.5625 μg/mL of honokiol and 0.125 mg/mL Nisin had the best synergistic inhibition effect on BF, reaching the highest at 18 h. Moreover, the combination of the two significantly affected the structure of BF and reduced the content of extracellular polysaccharide and eDNA, while the expression of BF-related genes *lasR*, *pelA*, *algC*, *pqsA* and *lasI* was reduced. Conclusion: The combination of Nisin and honokiol phenol has a synergistic effect on the biofilm of *P. aeruginosa* ATCC9027, which can reduce the transcription level of BF-related genes to decrease the secretion of EPS and eDNA, thus inhibiting and scavenging BF.

Keywords biofilm; *Pseudomonas aeruginosa*; Nisin; honokiol; synergistic; inhibition