

面包乳杆菌 ZHG2-1 对荧光假单胞菌群体感应的淬灭作用

吕欣然¹, 温馨¹, 王扬蕊¹, 白凤翎¹, 崔方超¹, 檀茜倩¹, 励建荣^{1,2*}, 郭晓华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山东美佳集团有限公司 山东日照 276800)

摘要 以紫色杆菌 CV026 为指示菌株,验证面包乳杆菌 ZHG2-1 群体感应淬灭活性,检测其对荧光假单胞菌生物膜、致病因子表型以及相关基因表达水平的影响,探究面包乳杆菌 ZHG2-1 对荧光假单胞菌群体感应的淬灭机制。结果表明:菌株 ZHG2-1 无细胞上清液对荧光假单胞菌 AHLs 的降解活性为 100%。在亚抑制质量浓度 (1.0,2.0,3.0 mg/mL) 下,菌株 ZHG2-1 粗提物对荧光假单胞菌生物膜的抑制率和清除率分别为在 9.66%~31.32%和 28.62%~62.82%范围,对胞外多糖、蛋白酶、脂肪酶、生物胺等致病因子抑制率在 7.23%~100%范围,并呈质量浓度依赖性。扫描电镜结果表明亚抑制质量浓度的菌株 ZHG2-1 粗提物处理使其生物膜量显著减少,细菌菌落处于分散状态。qRT-PCR 结果显示,菌株 ZHG2-1 粗提物对荧光假单胞菌群体感应基因 *rhlI* 和 *rhlR* 分别下调 0.93 和 0.99, *aprX*、*algA*、*orm*、*flgA*、*ldcA* 等生物膜和致病基因的表达水平也被显著抑制,说明面包乳杆菌 ZHG2-1 通过干扰荧光假单胞菌群体感应基因的表达,影响其生物膜和腐败因子的产生。本研究结果为开发水产品新型生物防腐剂提供理论依据。

关键词 面包乳杆菌 ZHG2-1; 群体感应淬灭; 荧光假单胞菌; 致病能力

文章编号 1009-7848(2023)11-0056-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2023.11.006

荧光假单胞菌(*Pseudomonada fluorescens*)作为水产品中常见的优势腐败菌,其自身分泌的蛋白酶、脂肪酶、嗜铁素、生物膜等因子受 *N*-酰基-高丝氨酸内酯 (*N*-Acyl-homoserine lactones, AHLs)介导的 LuxI/R 型 QS 系统调控^[1-2]。常通过使用抗生素等化学制剂控制腐败微生物对水产品的污染,然而长期使用不仅使细菌产生耐药性,还危害人体健康。以细菌 QS 系统为作用靶点,干扰其相关致病因子的表达,为控制由荧光假单胞菌引发的食品腐败提供新策略。

群体感应淬灭(Quorum quenching, QQ)是以 QS 系统为靶点,通过抑制 AHLs 合成、干扰 AHLs 与受体蛋白结合或酶促降解 AHLs 等途径淬灭细菌群体感应效应的一种方式^[3]。其中,降解 AHLs 信号分子,使其浓度低于临界值,抑制细菌相关毒

力因子表达的酶称之为群体感应淬灭酶(Quorum quenching enzymes, QQE)。其具有专一性强、催化效率高、安全无毒等优点,是目前最为有效的群体感应淬灭途径。依据结构特性,QQE 主要包括 AHLs 内酯酶、AHLs 酰基转移酶、AHLs 氧化还原酶^[4],根据来源可分为植物源、动物源、微生物源^[5-7]。乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)作为国际公认的安全菌株,已被广泛应用在食品工业领域。研究表明,乳酸菌来源的苯乳酸、细菌素和青霉素酰化酶等代谢产物具有良好的群体感应淬灭活性^[8-10],而同种或不同种微生物分泌的淬灭酶结构和催化特性的差异性,导致其淬灭机制也存在一定差异。本课题组前期获得的面包乳杆菌(*Lactobacillus crustorum*)ZHG2-1 具有 QQ 活性,对 C4-HSL、C8-HSL 和 3-oxo-C12-HSL 等 AHLs 信号分子均具有较强的降解作用,该活性物质初步鉴定为 AHLs-酰基转移酶或氧化-还原酶^[11],然而,其对荧光假单胞菌群体感应的淬灭机制尚不清楚。

鉴于上述问题,本文以面包乳杆菌 ZHG2-1 为研究对象,利用双层琼脂扩散法分析菌株 ZHG2-1 对荧光假单胞菌 AHLs 的降解效果。通过

收稿日期: 2022-11-29

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0901702);辽宁省博士科研启动基金计划项目(2020-BS-236)

第一作者: 吕欣然,女,博士,讲师

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

测定生物膜、胞外蛋白酶、胞外多糖、生物胺等腐败指标,探究菌株 ZHG2-1 对荧光假单胞菌的细胞表型淬灭效应。采用 qRT-PCR 技术研究菌株 ZHG2-1 对荧光假单胞菌致病因子基因水平的影响,阐明其淬灭机制,以期为开发水产品新型生物防腐剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌种及培养条件 面包乳杆菌(*Lactobacillus crustorum*)ZHG 2-1,分离自辽宁阜新彰武腌制酸黄瓜。荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)PF08,分离自腐败大菱鲆。

紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)CV026 为紫色杆菌 ATCC 31532 的 mini-Tn5 突变体,菌株自身不产生 AHLs,仅当外源 AHLs 存在时,可产生特征性紫色菌素,检测酰基侧链长度为 C4~C8 的信号分子。以上菌种均于本实验室保藏。

1.1.2 培养基与试剂 MRS 肉汤、LB 肉汤、LB 培养基,北京奥博星生物技术有限公司;乙酸乙酯(分析纯级),福晨(天津)化学试剂有限公司;AO/EB 双荧光染色试剂盒,北京雷根生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

Imark 酶标仪,美国 BIO-RAD 公司;MS105UD 电子分析天平,瑞士梅特勒-托利多有限公司;SS-4800 场发射扫描电子显微镜,日本日立公司;徕卡激光共聚焦显微镜,德国徕卡仪器有限公司;Bioscern C 全自动生长曲线分析仪,上海谓载商贸发展有限公司 5804R 高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;DL-CJ-2N 超级洁净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;SPX-25 生化培养箱,宁波海曙赛福实验仪器厂;RE-2000A 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;Multifuge1L-R 高速冷冻离心机,德国 Heraeus 公司;SCIENTZ-10N/A 冷冻干燥机,宁波新芝生物科技股份有限公司;立式自动压力蒸汽灭菌器 GI80DS,致微(厦门)仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 菌株 ZHG2-1 上清液与荧光假单胞菌

AHLs 的制备

1.3.1.1 菌株 ZHG2-1 上清液粗提物的制备 参照 Lv 等^[12]方法,将面包乳杆菌 ZHG2-1 以 2% 的接种量在 MRS 肉汤中活化至第 3 代,离心过滤得乳酸菌无细胞上清液(Cell free supernatants, CFS),用乙酸乙酯萃取 CFS 活性成分,经真空旋转蒸发、真空冷冻干燥制成粉末状固体,置于-80℃冰箱备用。

1.3.1.2 荧光假单胞菌 AHLs 粗提物的制备 将荧光假单胞菌在 LB 肉汤中培养,传代 2 次后于 30℃培养 16 h,离心过滤后用含 0.01%冰醋酸的乙酸乙酯萃取,50℃下真空旋转蒸发以消除有机溶剂并用 70%甲醇溶解。

1.3.2 菌株 ZHG2-1 对荧光假单胞菌 AHLs 淬灭活性验证 参照 Cui 等^[11]方法制备 AHLs 检测平板,牛津杯打孔。将菌株 ZHG2-1 CFS 调至中性,加入 10 μL 荧光假单胞菌 AHLs 粗提物,30℃培养 24 h,离心后取上清,调 pH 值至中性,取 180 μL 加入打好的孔中,30℃培养 24 h。

1.3.3 荧光假单胞菌与紫色杆菌 CV026 的最小抑菌浓度与亚抑制质量浓度 将菌悬液浓度为 10⁶ CFU/mL 的荧光假单胞菌与紫色杆菌 CV026 (100 μL)分别加入 96 孔板中,依次加入 10 μL 上清液粗提物至终质量浓度分别为 0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0 mg/mL,以不添加提取物的 LB 肉汤作为阴性对照,30℃静置培养 24 h。在波长 595 nm 处每隔 2 h 测 OD 值。

1.3.4 菌株 ZHG2-1 上清液粗提物对荧光假单胞菌产生物膜量的影响

1.3.4.1 生物膜抑制的定量分析 取 200 μL 荧光假单胞菌悬液到 96 孔板中,添加菌株 ZHG2-1 粗提物至终质量浓度为 1.0, 2.0, 3.0 mg/mL,以不添加提取物的 LB 肉汤作为阴性对照,30℃培养 12 h,吸去多余悬浮液,用无菌 PBS 洗涤,参照 Shikha 等^[9]方法结晶紫染色定量检测生物膜量。同时,参考 Cui 等^[11]方法测定浮游细胞存活率。

1.3.4.2 生物膜清除的定量分析 在 96 孔板中加入荧光假单胞菌培养物(10⁶ CFU/mL),30℃培养 12 h,移除悬浮液,PBS 洗涤后,向孔板中添加不同亚抑制质量浓度的菌株 ZHG2-1 粗提物,以不添加粗提物的 LB 肉汤作为阴性对照,30℃培

养 24 h, 按上述方法定量检测生物膜残留量和浮游细胞存活率。

1.3.5 菌株 ZHG2-1 上清液粗提物对荧光假单胞菌生物膜结构的影响 在 24 孔板中放入无菌硅片(1 cm×1 cm), 取 1 mL 荧光假单胞菌菌液浸没, 样品处理如 1.3.4 节方法。PBS 洗涤硅片, 2.5% 戊二醛固定 12 h, 无菌水洗涤 3 次, 40%, 70%, 90%, 100% 乙醇依次脱水处理 15 min, 待硅片干燥后喷金, 扫描电镜(SEM)观察生物膜结构。

1.3.6 菌株 ZHG2-1 上清液粗提物对荧光假单胞菌致病因子的影响

1.3.6.1 胞外多糖 参照 Mohammed 等^[13]方法, 将荧光假单胞菌与不同亚抑制质量浓度的菌株 ZHG2-1 粗提物 30 °C 共培养 16 h, 离心, 将沉淀重悬于 0.85% NaCl 溶液中, 离心 30 min, 将上清液与冷乙醇按体积比 1:3 混合, 4 °C 过夜沉淀, 移除上清液后, 苯酚硫酸法定量检测胞外多糖含量。

1.3.6.2 胞外蛋白酶 参照 Vijayaraghavan 等^[14]方法制备脱脂牛奶平板, 牛津杯打孔。将不同质量浓度的菌株 ZHG2-1 粗提物与荧光假单胞菌 30 °C 共培养 24 h, 离心过滤后取 180 μL 上清液加入打好的孔中, 30 °C 培养 24 h, 测量孔径周围透明圈的大小, 计算抑制率。

1.3.6.3 生物胺 根据张黎明等^[15]的方法制备生物胺检测培养基, 牛津杯打孔。取 180 μL 菌株 ZHG2-1 粗提物与荧光假单胞菌共培养物上清液加入孔中, 30 °C 培养 24 h, 测量孔径周围蓝紫色圈的大小, 计算抑制率。

1.3.6.4 脂肪酶 根据 Leelatulasi 等^[16]方法并稍作修改。50 mL 沸水将 3 mL 三丁甘油酸酯和 1 g 聚乙烯醇-2000 混合乳化, 调 pH 值至中性, 取 4 mL 乳化液与 100 mL LB 琼脂混合, 制备脂肪酶琼脂平板。取 180 μL 共培养物上清液加入孔中, 30 °C 培养 24 h, 测量孔径周围透明圈的大小, 计算抑制率。

1.3.7 菌株 ZHG2-1 上清液粗提物对荧光假单胞菌 QS、生物膜及致病基因表达的影响 将过夜活化的荧光假单胞菌菌液稀释至 10⁶ CFU/mL, 加入 3.0 mg/mL 菌株 ZHG2-1 粗提物, 30 °C 培养 24 h, 离心, 弃上清, 无菌 PBS (pH 7.2) 洗涤沉淀, 再次离心收集菌体。将菌体送至北京华大蛋白质研发中心进行 qRT-PCR 测试。qRT-PCR 用 Gene 9600 定量 PCR 仪进行, 引物序列见表 1, 荧光假单胞菌的 16S rRNA 为内参基因, 引物由上海 Sangon Biotech 公司设计并合成。

表 1 荧光假单胞菌 qRT-PCR 引物序列

Table 1 The qRT-PCR primer sequences of *Pseudomonas fluorescens*

基因	基因功能	引物方向	引物序列	扩增长度/bp
16S rRNA	16S 核糖体 RNA	正向	GCTTTCGCCCATTTGTCCAA	133
		反向	TGCTGGGGTAATGGCTCAC	
rhlI	AHLs 合成酶	正向	AAGTCTTCGGGTTTCTGTGC	168
		反向	TCACTGCCACCACCTGATTA	
rhlR	AHLs 受体蛋白	正向	GACCCCTTTTACCCGACCA	155
		反向	CAAACAGTCCGTCGTTCCA	
aprX	胞外蛋白酶	正向	TAACGAGCCGCAGACCCT	83
		反向	AGCCATCAACCGCTACGC	
algA	藻酸盐合成蛋白	正向	GATGCTGGTCAATGAAGGCC	142
		反向	TACACCGAACAGCACCATCT	
orm	嗜铁素	正向	AGTGTCTCCCCAGAGTTCA	95
		反向	CTGAATAGTTGGTGTGTGGT	
flgA	鞭毛合成蛋白	正向	TGGAACAGGCAGAAGTGGT	160
		反向	CGAGCCTTGATCACACGTT	
ldcA	赖氨酸脱羧酶	正向	AACCAATCAGCCGTCGCCACCC	231
		反向	TATCTCCACCTCGCCGAGTA	

1.4 数据处理与分析

每组试验设 3 个平行, 用 SPSS 19.0 软件进行数据的分析处理, Origin 8.5 软件进行绘图处理。

2 结果与分析

2.1 菌株 ZHG2-1 对荧光假单胞菌 AHLs 的降解活性

采用双层琼脂扩散法检测面包乳杆菌 ZHG2-1 CFS 对荧光假单胞菌 AHLs 的降解活性。由图 1 可知, 菌株 ZHG2-1 CFS 对荧光假单胞菌 AHLs 的降解活性为 100%。

2.2 荧光假单胞菌和紫色杆菌 CV026 的最小抑菌浓度与亚抑制质量浓度

面包乳杆菌 ZHG2-1 上清液粗提物对荧光假单胞菌和紫色杆菌的最小抑菌浓度分别为 8.0 mg/mL 和 4.0 mg/mL。为确认菌株 ZHG2-1 粗提物的降解活性是出自群体感应淬灭作用, 还是抑菌

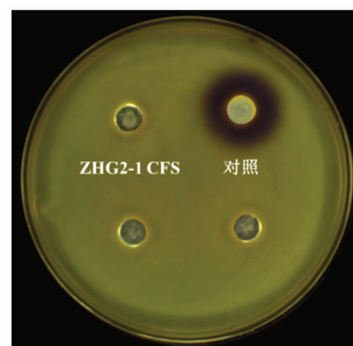


图 1 菌株 ZHG2-1 CFS 对荧光假单胞菌 AHLs 淬灭活性

Fig.1 The quenching activity of strain ZHG2-1 CFS on *Pseudomonas fluorescens* AHLs

作用, 研究不同亚抑制质量浓度对荧光假单胞菌和紫色杆菌生长的影响。由图 2 可知, 1.0, 2.0, 3.0 mg/mL 的菌株 ZHG2-1 粗提物对荧光假单胞菌和紫色杆菌的生长均无影响, 选取这 3 个质量浓度作后续研究。

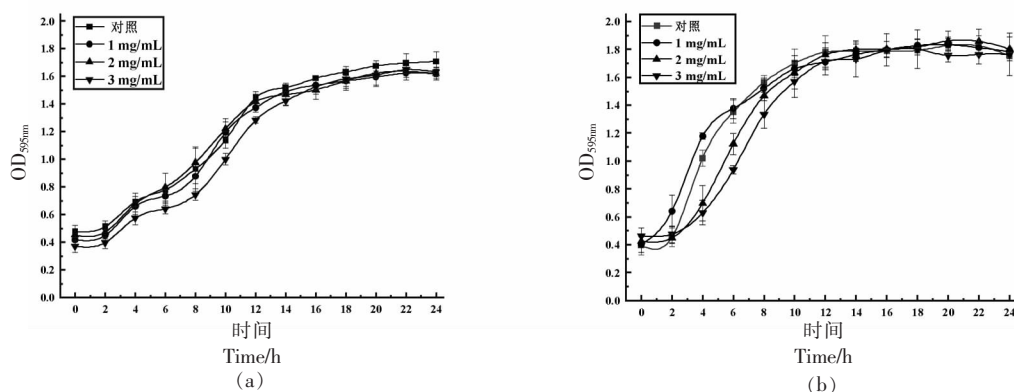


图 2 亚抑制质量浓度下菌株 ZHG2-1 粗提物对荧光假单胞菌(a)和紫色杆菌(b)生长的影响

Fig.2 Effects of strain ZHG2-1 crude extract on the growth of *Pseudomonas fluorescens* (a) and *Chromobacterium violaceum* (b) at sub-inhibitory mass concentrations

2.3 面包乳杆菌 ZHG2-1 对荧光假单胞菌产生生物膜量的影响

生物膜指黏附在物体表面的细菌与其分泌的胞外基质聚集形成的群落组织, 其对外界环境变化的抵抗力远高于浮游细胞^[17]。在食品加工中, 细菌能快速附着在设备及食品表面形成生物膜, 并难以清除, 给食品工业带来严峻考验^[18]。图 3 所示, 在不影响荧光假单胞菌生长的前提下, 质量浓度为 1.0, 2.0, 3.0 mg/mL 的菌株 ZHG2-1 粗提物对

荧光假单胞菌生物膜抑制率分别为 $(9.66 \pm 2.92)\%$, $(20.46 \pm 3.72)\%$, $(31.32 \pm 3.39)\%$, 清除率分别为 $(28.62 \pm 3.20)\%$, $(37.07 \pm 3.82)\%$, $(62.82 \pm 5.84)\%$, 且呈质量浓度依赖性。Shikha 等^[9]研究发现鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) 上清液对铜绿假单胞菌生物膜形成的抑制率为 35.01%, 对成熟生物膜的清除率约为 75%, 本研究结果与其相近。上述结果说明菌株 ZHG2-1 粗提物通过群体感应有效抑制和清除荧光假单胞菌生物膜。

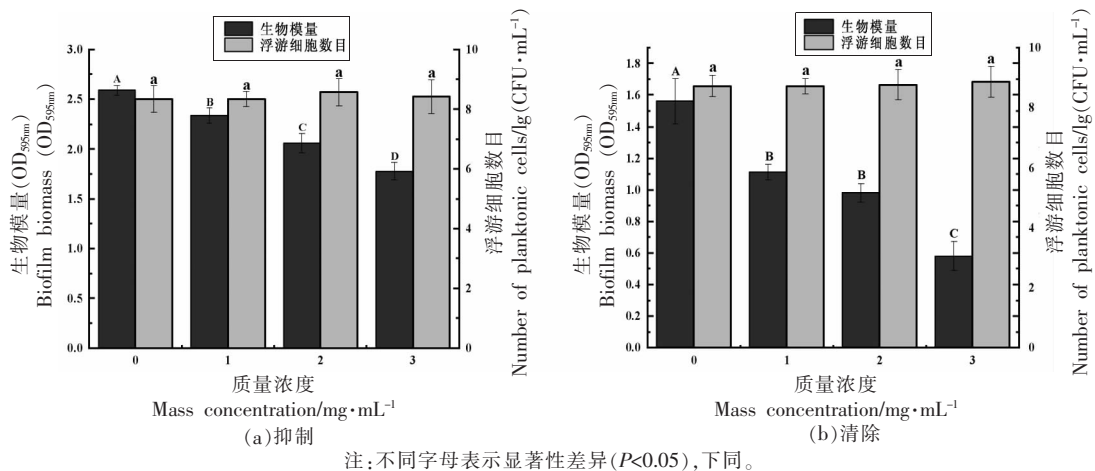


图3 菌株 ZHG2-1 粗提取物对荧光假单胞菌生物膜量及浮游细胞数目的影响

Fig.3 The effects of strain ZHG2-1 crude extract on the *Pseudomonas fluorescens* biofilm biomass and number of planktonic cells

2.4 面包乳杆菌 ZHG2-1 对荧光假单胞菌生物膜结构的影响

利用扫描电镜观察亚抑制质量浓度菌株 ZHG2-1 粗提取物对荧光假单胞菌生物膜二维结构的影响,如图 4 所示,未经处理的荧光假单胞菌生物膜厚实紧密,随着菌株 ZHG2-1 粗提取物质量浓度的不断增大,致密的膜结构逐渐被解体。当用 3.0 mg/mL 的菌株 ZHG2-1 粗提取物处理时,细菌胞外聚合物显著减少,细菌菌落处于分散状态。结果表明,菌株 ZHG2-1 粗提取物可通过抑制荧光假单胞菌胞外基质的形成,减弱细菌生物膜形成能力。

图 4b 显示经菌株 ZHG2-1 粗提取物处理、预先形成生物膜后,生物膜结构疏松分散,抑制效果没有清除效果显著,表明菌株 ZHG2-1 粗提取物可破坏荧光假单胞菌成熟生物膜结构。Lv 等^[12]研究发现植物乳杆菌 CY 1-1 粗提取物处理的温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*) 数量减少且黏附性差,3.0 mg/mL 粗提取物处理几乎没有形成生物膜。1.0,2.0 mg/mL 和 3.0 mg/mL CY1-1 粗提取物处理后的成熟生物膜结构稀疏,形成量显著低于对照组,本研究结果与其一致。

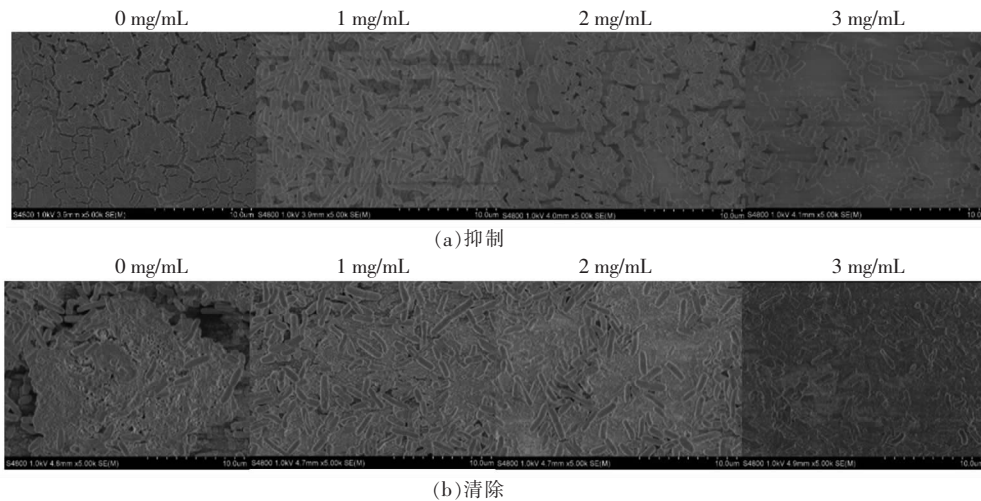


图4 菌株 ZHG2-1 粗提取物对荧光假单胞菌生物膜结构的影响

Fig.4 Effects of strain ZHG2-1 crude extract on *Pseudomonas fluorescens* biofilm structure

2.5 面包乳杆菌 ZHG2-1 对荧光假单胞菌产胞外多糖的影响

胞外多糖是组成细菌生物膜的重要基质,主要由藻酸盐、生物被膜胞外基质多聚糖以及在菌膜和生物被膜的形成过程中起作用的胞外多糖(Pel)等构成^[19]。与如图 5a 所示,菌株 ZHG2-1 粗提物可显著降低荧光假单胞菌胞外多糖分泌,并显示质量浓度依赖性。与对照组相比,当用 3.0 mg/mL 菌株 ZHG2-1 粗提物处理细菌时,抑制率达(64.08±4.47)%。Yeon 等^[20]研究发现酿酒酵母无细胞上清液对单增李斯特菌胞外多糖的抑制率为 65.1%~86.02%,本研究结果与其相似。

2.6 面包乳杆菌 ZHG2-1 对荧光假单胞菌产胞外蛋白酶的影响

荧光假单胞菌可分泌胞外蛋白酶,能将水产品中富含的蛋白质、脂质、游离氨基酸等成分降解,产生致腐代谢物,使水产品丧失原有风味和品质^[21]。由图 5b 可知,随着菌株 ZHG2-1 粗提物质量浓度的增大,荧光假单胞菌分解蛋白能力不断被减弱,3.0 mg/mL 时抑制率达 100%,结果表明,菌株 ZHG2-1 上清液提取物能显著抑制荧光假单胞菌的胞外蛋白酶的产生。Chu 等^[22]研究发现芽孢杆菌上清液对嗜水气单胞菌 YJ-1 蛋白酶抑制率为 83.9%,本研究结果与其相似。

2.7 面包乳杆菌 ZHG2-1 对荧光假单胞菌产生生物胺影响

生物胺是一类低分子碱性含氮化合物,主要由微生物产生的氨基酸脱羧酶分解游离氨基酸形成。水产品腐败会产生大量生物胺,过量积累会对人体造成毒害作用^[23]。生物胺平板的原理是细菌可分解培养基中游离氨基酸,溴甲酚紫可与产生的碱性生物胺呈蓝紫色反应,蓝紫色圈直径越大,细菌产生物胺能力越强。如图 5c 所示,对照组中,荧光假单胞菌有很强的产胺能力,而 1.0 mg/mL 菌株 ZHG2-1 粗提物可完全抑制生物胺的产生,结果表明,较低质量浓度的菌株 ZHG2-1 粗提物可显著抑制荧光假单胞菌生物胺的产生。冯杰等^[24]研究发现 2.0 mg/mL 蓝莓花色苷对波罗的海希瓦氏菌(*Shewanella baltica*)腐胺含量的抑制率为 94.4%,本研究结果与其相似。

2.8 面包乳杆菌 ZHG2-1 对荧光假单胞菌产生脂肪酶的影响

脂肪酶被定义为甘油三酯酰基水解酶。假单胞菌属通过分泌脂肪酶催化甘油三酯分解为脂肪酸、甘油等物质,会改变肉制品肌肉组织,从而使肉制品变黏、变色、产生异味,导致腐败发生^[25-26]。本文采用三丁酸甘油酯平板透明圈法研究不同质量浓度菌株 ZHG2-1 粗提物对荧光假单胞菌脂肪酶活性的影响。如图 5d 所示,1.0 mg/mL 菌株 ZHG2-1 粗提物抑制率为(44.09±3.95)%,随着质量浓度的增大,抑制活性可达 100%。Shen 等^[27]研究发现来源于荧光假单胞菌的 AHLs-酰基转移酶 PF-1240 可干扰蜂房哈夫尼亚菌脂肪酶的形成,本研究结果与其相似。

2.9 面包乳杆菌 ZHG2-1 对荧光假单胞菌 QS、生物膜及致腐基因表达的影响

为了探究 ZHG2-1 的群体感应淬灭机制,通过 qRT-PCR 检测 ZHG2-1 对荧光假单胞菌 QS、生物膜及致腐基因的表达水平。在荧光假单胞菌 QS 系统中,*rhlI* 编码的是 AHLs 合成酶,*rhlR* 编码的是 AHLs 受体蛋白,两者组成的 *rhlIR* 系统共同调控荧光假单胞菌 QS 现象^[28]。*aprX* 是荧光假单胞菌胞外蛋白酶基因^[29]。*algA* 编码的藻酸盐合成蛋白是构成胞外多糖的重要组分,不仅利于细菌的黏附和定殖,在生物膜成熟后期还可以帮助细菌摄取和利用环境中的微量元素^[30]。*orm* 是嗜铁素合成基因,有助于细菌络合食品基质中的 Fe³⁺^[31]。*flgA* 编码与生物膜形成以及细菌运动能力相关的鞭毛合成蛋白^[32]。*ldcA* 编码赖氨酸脱羧酶,细菌通过酶解食品中的游离氨基酸,进而形成生物胺^[33]。

由图 6 可知,3.0 mg/mL ZHG2-1 处理下,*rhlI* 和 *rhlR* 的基因表达被显著下调 0.93 和 0.99,与荧光假单胞菌生物膜及腐败特性相关的 *aprX*、*algA*、*orm*、*flgA*、*ldcA* 等基因的表达水平也被显著抑制,分别下调 0.91、0.79、0.90、0.94、0.93,这与前期腐败表型的结果一致。Toushik 等^[34]研究发现植物乳杆菌 J.27 和 M.21 可以下调致病菌生物膜形成及 QS 相关基因表达,qRT-PCR 结果与其相似。乳酸菌分泌的群体感应淬灭活性物质可以下调 QS (*luxS*、*lasB*、*rhlR*、*pfs*) 相关基因的表达,从而使食

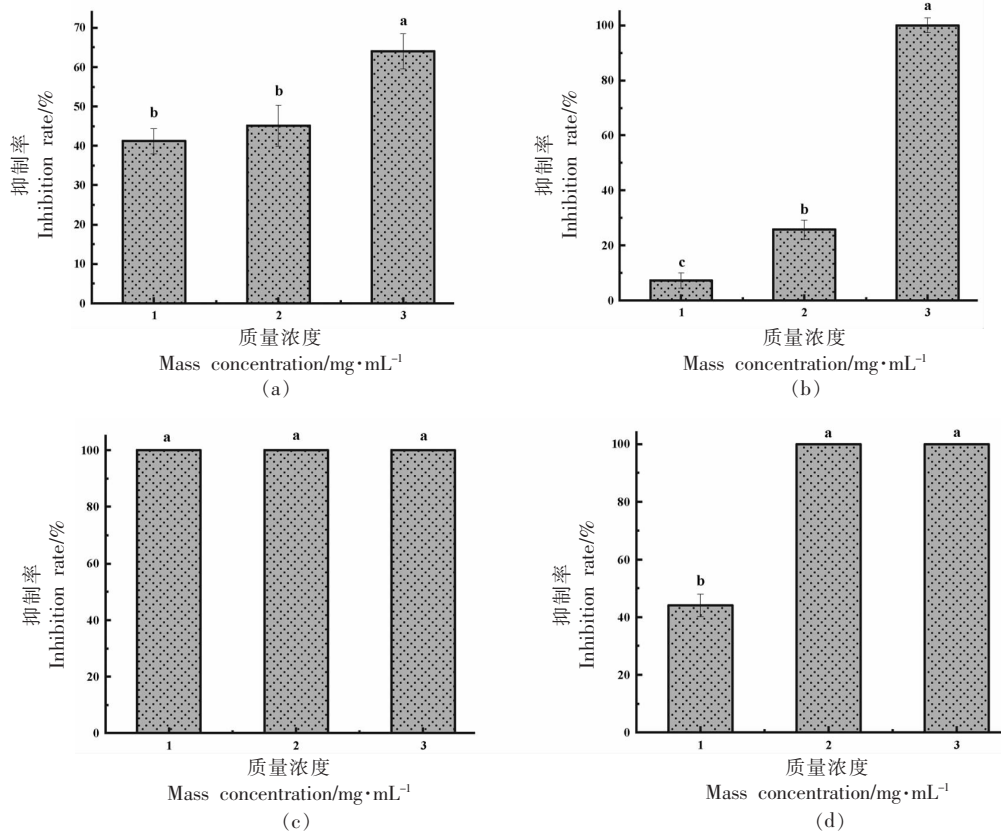


图5 菌株 ZHG2-1 粗提物对荧光假单胞菌产胞外多糖(a)、胞外蛋白酶(b)、生物胺(c)、脂肪酶(d)影响

Fig.5 Effects of strain ZHG2-1 crude extract on *Pseudomonas fluorescens* production of extracellular polysaccharides (a), extracellular proteases (b), biogenic amines (c), and lipases (d)

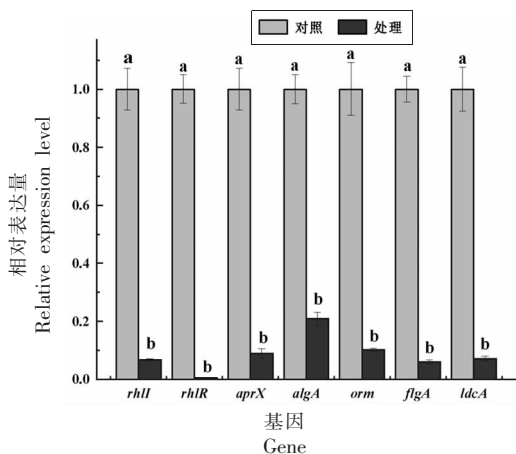


图6 3.0 mg/mL 菌株 ZHG2-1 粗提物对荧光假单胞菌 QS、生物膜及致腐基因表达的影响

Fig.6 Effects of 3.0 mg/mL strain ZHG2-1 crude extract on the expression of QS, biofilm and putrefaction genes of *Pseudomonas fluorescens*

源性致病菌致病性下降^[35]。由此推测面包乳杆菌 ZHG2-1 可通过干扰 QS 基因表达,进而影响荧光

假单胞菌生物膜和腐败因子的产生。

3 结论

面包乳杆菌 ZHG2-1 具有较强的群体感应淬灭活性,其乙酸乙酯提取物可显著抑制荧光假单胞菌生物膜及相关致腐因子的产生。菌株 ZHG2-1 粗提物对荧光假单胞菌生物膜形成量及预先形成的成熟生物膜量均有显著的抑制作用。扫描电镜进一步显示菌株 ZHG2-1 粗提物处理使其生物膜量显著减少,细菌菌落处于分散状态。在亚抑制质量浓度的菌株 ZHG2-1 粗提物处理下,荧光假单胞菌胞外多糖、生物胺、蛋白酶、脂肪酶等致腐因子均被显著抑制,与细菌 QS、生物膜、腐败因子相关的基因表达水平也被显著下调。综上所述,面包乳杆菌 ZHG2-1 作为天然安全的生物防腐剂,通过干扰细菌 QS 系统,调控生物膜和致腐基因表达,进而影响生物膜及相关腐败因子的产生,其具体机制可通过转录组学进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 崔天琦, 白凤翎, 励建荣. 基于 AHLs 介导的革兰氏阴性菌群体感应调控及淬灭机制研究进展[J]. 中国食品学报, 2020, 20(8): 308-320.
- CUI T Q, BAI F L, LI J R. Advance on quorum-sensing regulation and quenching mechanism of Gram-negative bacteria mediated by AHLs[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(8): 308-320.
- [2] LIU X X, JI L, WANG X, et al. Role of RpoS in stress resistance, quorum sensing and spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 270: 31-38.
- [3] SIKDAR R, ELIAS M. Quorum quenching enzymes and their effects on virulence, biofilm, and microbiomes: A review of recent advances[J]. Expert Review of Anti-Infective Therapy, 2020, 18: 1-13.
- [4] ZHAO J, LI X Y, HOU X Y, et al. Widespread existence of quorum sensing inhibitors in marine bacteria: Potential drugs to combat pathogens with novel strategies[J]. Marine Drugs, 2019, 17(5): 275-296.
- [5] BERGONZI C, SCHWAB M, NAIK T, et al. Structural and biochemical characterization of AaL, a quorum quenching lactonase with unusual kinetic properties[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 11262.
- [6] PAN Y L, WANG Y B, YAN X Q, et al. Quorum quenching enzyme APTM01, an acylhomoserine-lactone acylase from marine bacterium of *Pseudoalteromonas tetraodonis* Strain MQS005[J]. Current Microbiology, 2019, 76(12): 1387-1397.
- [7] KHALID S J, AIN Q, KHAN S J, et al. Targeting acyl homoserine lactones (AHLs) by the quorum quenching bacterial strains to control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2022, 29(3): 1673-1682.
- [8] LAMBERT J M, BONGERS R S, DE V W M, et al. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(15): 4719-4726.
- [9] SHIKHA R, SHALAKA B, ANKITA K, et al. pH-dependent inhibition of AHL-mediated quorum sensing by cell-free supernatant of lactic acid bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 142: 1-8.
- [10] PARK H, YEO S, JI Y, et al. Autoinducer-2 associated inhibition by *Lactobacillus sakei* NR28 reduces virulence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. Food Control, 2014, 45(12): 62-69.
- [11] CUI T Q, BAI F L, SUN M T, et al. *Lactobacillus crustorum* ZHG 2-1 as novel quorum-quenching bacteria reducing virulence factors and biofilms formation of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. LWT, 2020, 117: 1-8.
- [12] LV X R, CUI T Q, DU H, et al. *Lactobacillus plantarum* CY 1-1: A novel quorum quenching bacteria and anti-biofilm agent against *Aeromonas sobria*[J]. LWT, 2020, 137: 110439.
- [13] MOHAMMED A, ANEEQHA N, BRISTI K, et al. Lactic acid bacteria inhibits quorum sensing and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* strain JUPG01 isolated from rancid butter[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2021, 36: 1-9.
- [14] VIJAYARAGHAVAN P, GNANA S, VINCENT P. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye [J]. Journal of Biochemical Technology, 2013, 4(3): 628-630.
- [15] 张黎明, 章祎, 赵云松, 等. 腌鱼中产生生物胺菌株的筛选、鉴定及其特性研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(7): 291-299.
- ZHANG L M, ZHANG Y, ZHAO Y S, et al. Screening, identification and characteristics of biogenic amines producing strains in salted fish [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(7): 291-299.
- [16] LEELATULASI S, RAJA N Z R A R, ABU B S, et al. New recombinant cold-adapted and organic solvent tolerant lipase from psychrophilic *Pseudomonas* sp. LSK25, isolated from signy island Antarctica[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(6): 1264-1285.
- [17] HOUDT R V, MICHIELS C W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109(4): 1117-1131.
- [18] SHIVAPRASAD D, NEETU K T, ANUPAMA L, et

- al. *In vitro* and *in situ* abrogation of biofilm formation in *E. coli* by vitamin C through ROS generation, disruption of quorum sensing and exopolysaccharide production[J]. Food Chemistry, 2021, 341: 1–11.
- [19] HENTZER M, TEITZEL G M, BALZER G J, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183 (18): 5395–5401.
- [20] YEON J K, HWAN H Y, YE J S, et al. Anti-biofilm effect of the cell-free supernatant of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* against *Listeria monocytogenes*[J]. Food Control, 2021, 121: 1–7.
- [21] 李婷婷, 崔方超, 励建荣, 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): 54–60.
- LI T T, CUI F C, LI J R, et al. Influence of quorum sensing AHLs on spoilage factor secretion of *Aeromonas sobria*[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(3): 54–60.
- [22] CHU W H, ZHOU S X, ZHU W, et al. Quorum quenching bacteria *Bacillus sp.* QSI-1 protect zebrafish (*Danio rerio*) from *Aeromonas hydrophila* infection[J]. Scientific Reports, 2014, 4(1): 5446–5452.
- [23] 刘爱芳, 谢晶, 钱韵芳. 冷藏金枪鱼优势腐败菌致腐败能力[J]. 食品科学, 2018, 39(3): 7–14.
- LIU A F, XIE J, QIAN Y F. Spoilage potential of dominant spoilage bacteria from Chilled Tuna (*Thunnus obesus*)[J]. Food Science, 2018, 39(3): 7–14.
- [24] 冯杰. 大黄鱼特定腐败菌 *S. baltica* 信号分子与生物胺消长关系及调控[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2018.
- FENG J. Vicissitude and regulation of signal molecular and biogenic amines in *S. baltica*, specific spoilage organism in large yellow croaker [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang Univeisity, 2018.
- [25] 查代明, 闫云君. 细菌脂肪酶基因表达调控的研究进展[J]. 微生物学报, 2015, 55(11): 1378–1384.
- ZHA D M, YAN Y J. Progress in expression regulation of bacterial lipase genes – A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2015, 55(11): 1378–1384.
- [26] 王虹懿, 吴海虹, 张新笑, 等. 绿原酸对荧光假单胞菌群体感应现象及其腐败特性的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2020, 41(7): 95–101.
- WANG H Y, WU H H, ZHANG X X, et al. Inhibitory activity of chlorogenic acid on the quorum Sensing of *Pseudomonas fluorescens* and its spoilage activity[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(7): 95–101.
- [27] SHEN Y, CUI F C, WANG D F, et al. Quorum quenching enzyme (PF-1240) capable to degrade AHLs as a candidate for inhibiting quorum sensing in food spoilage bacterium *Hafnia alvei*[J]. Foods, 2021, 10(11): 2700–2714.
- [28] 王当丰. 基于 *rhIIIR* 系统的大菱鲆荧光假单胞菌群体感应及 AHLs 窃听现象初步研究[D]. 锦州: 渤海大学, 2018.
- WANG D F. Study on quorum sensing of *Pseudomonas fluorescens* based an *rhIIIR* system and AHLs intercreeption [D]. Jinzhou: Bohai University, 2018.
- [29] 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.
- [30] WOZNIAK D J, WYCKOFF T J, STARKEY M, et al. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003, 100(13): 7907–7912.
- [31] 唐蓉. 鱼源致腐菌荧光假单胞菌群体感应 LuxI/LuxR 鉴定及生理功能研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2019.
- TANG R. Identification of quorum sensing system LuxI/R and its physiological functional in fish spoiler *Pseudomonas fluorescens* [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang Univeisity, 2019.
- [32] 刘楠. 香芹酚对荧光假单胞菌 PF-08 群体感应的抑制作用及其在保鲜中的应用[D]. 锦州: 渤海大学, 2018.
- LIU N. Study on inhibition of quorum sensing of *Pseudomonas fluorescens* PF-08 by carvacrol and its preservation[D]. Jinzhou: Bohai University, 2018.
- [33] 王雅莹. 基于群体感应研究香芹酚对鱼源荧光假单胞菌单/混生物被膜的抑制作用[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2020.
- WANG Y Y. Inhibition of carvacrol against the mono/dual-Biofilm of *Pseudomonas fluorescens* based on quorum sensing [D]. Hangzhou: Zhejiang Gong-

- shang Univeisity, 2020.
- [34] TOUSHIK S H, KIM K, ASHRAFUDOULLA M, et al. Korean kimchi-derived lactic acid bacteria inhibit foodborne pathogenic biofilm growth on seafood and food processing surface materials[J]. Food Control, 2021, 129: 1–12.
- [35] KAREB O, AİDER M. Quorum sensing circuits in the communicating mechanisms of bacteria and its implication in the biosynthesis of bacteriocins by lactic acid bacteria: A review[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2019, 12(1): 5–17.

Quorum Quenching Effects of *Lactobacillus crustorum* ZHG2-1 on *Pseudomonas fluorescens*

Lü Xinran¹, Wen Xin¹, Wang Yangrui¹, Bai Fengling¹, Cui Fangchao¹, Tan Xiqian¹,
Li Jianrong^{1,2*}, Guo Xiaohua³

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 Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning

³Shandong Meijia Group Co. Ltd., Rizhao 276800, Shandong)

Abstract In this study, quorum-sensing quenching activity of *Lactobacillus crustorum* ZHG2-1 was verified with the *Chromobacterium violaceum* CV026 as a indicator strain. Based on the change of biofilm, phenotypes of spoilage factors and the expression levels of related genes, the quorum sensing quenching mechanism of *Lb. crustorum* ZHG2-1 on *P. fluorescens* was detected. The results showed that the degradation rate of cell-free supernatant from strain ZHG2-1 to *P. fluorescens* AHLs reached 100%. The sub-inhibitory concentration (1.0, 2.0, 3.0 mg/mL) of strain ZHG2-1 crude extract could inhibit and remove the biofilm of *P. fluorescens*, and the inhibition rate and clearance rate reached 9.66%–31.32% and 28.62%–62.82%, respectively. In addition, the inhibition rate of strain ZHG2-1 crude extract with sub-inhibitory concentration on *P. fluorescens* spoilage factors (exopolysaccharides, proteases, lipases, biogenic amines) reached 7.23%–100%. Meanwhile, the inhibition rate was mass concentration-dependent. Scanning electron microscope showed that the sub-inhibitory concentration of strain ZHG2-1 crude extract treatment significantly reduced the amount of biofilm and the bacterial colonies were in a dispersed state. The results of qRT-PCR showed that the crude extract of strain ZHG2-1 down-regulated the quorum-sensing genes *rhlI* and *rhlR* of *P. fluorescens* by 0.93 and 0.99, respectively, and the expression levels of *aprX*, *algA*, *orm*, *flgA*, *ldcA* and other biofilm and spoilage genes was significantly inhibited. The results indicated that *Lb. crustorum* interfered with the expression of quorum-sensing genes of *P. fluorescens*, thereby affecting the production of biofilm and spoilage factors.

Keywords *Lactobacillus crustorum* ZHG2-1; quorum quenching; *Psdeumnoda fluorescnes*; spoilage ability