

## 蒲公英-银纳米颗粒对三文鱼源哈夫尼亚菌 AHL 型群体感应系统的抑制作用

檀茜倩<sup>1,2</sup>, 裴建博<sup>1</sup>, 王晓晴<sup>1</sup>, 崔方超<sup>1</sup>, 孟玉琼<sup>3</sup>, 马睿<sup>3</sup>, 李学鹏<sup>1</sup>, 励建荣<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>渤海大学食品科学与工程学院/海洋研究院 辽宁锦州 121013

<sup>2</sup>天津科技大学食品科学与工程学院 天津 300457

<sup>3</sup>省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室 青海大学 西宁 810016)

**摘要** 群体感应(QS)是细菌间的一种通讯机制,抑制细菌 QS 系统可作为控制腐败菌的一种新策略,且可避免细菌耐药性的产生。本研究以 AgNO<sub>3</sub> 为银源,蒲公英植物提取物为还原剂,制备蒲公英-银纳米颗粒(D-AgNPs)。采用紫外可见吸收光谱、动态光散射、Zeta 电位、X 射线衍射、傅里叶变换红外光谱、扫描电镜和 X 射线能谱对其结构进行表征。结果表明:所合成的 D-AgNPs 为球形、平均粒径 13.9 nm、Zeta 电位值(-14.07±0.25)mV,主要含 Ag(68.96%)和 Cl(15.27%)两种元素。测定 D-AgNPs 对两株哈夫尼亚菌生长和受 QS 系统调控的生物被膜、N-酰基-L-高丝氨酸内酯(AHLs)、蛋白酶、胞外多糖、群集和泳动等毒力因子的影响,结果表明 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌最小抑菌质量浓度(MIC)为 128 μg/mL,在 1/16~1/2 MIC (8~64 μg/mL) 时可抑制哈夫尼亚菌生物被膜的形成,在 1/128~1/32 MIC (1~4 μg/mL) 时促进其生物被膜形成。对 AHLs、蛋白酶产生、群集和泳动均显示不同程度的抑制,而对胞外多糖的产生有一定促进作用。本研究证实 D-AgNPs 可作为一种 QS 抑制剂。

**关键词** 银纳米颗粒; 哈夫尼亚菌; 群体感应; 绿色合成; 三文鱼

**文章编号** 1009-7848(2024)03-0210-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.03.021

银纳米颗粒(silver nanoparticles, AgNPs)是粒径在 1~100 nm 的颗粒,研究发现其具有优良的抑菌性能,可通过破坏细菌细胞膜、呼吸链和干扰 DNA 复制等机制对细菌生长进行抑制<sup>[1]</sup>。银纳米颗粒的抑菌谱相对较宽,除了上述几种抑菌机制,银纳米颗粒还具有干扰细菌群体感应(quorum sensing, QS)系统的能力<sup>[2]</sup>。细菌群体感应是细菌种内和种间的一种交流和通讯机制,与细菌致病和致腐能力有关,不同于抗生素抑菌,会使细菌产生耐药性,以 QS 系统为靶点的细菌靶向抑制策略可在一定程度上避免细菌耐药性产生<sup>[3-4]</sup>。研究发现利用印度藏茴香(*Carum copticum*)种子提取物合成的银纳米颗粒,可通过抑制铜绿假单胞菌、紫色杆菌、黏质沙雷氏菌的 QS 系统控制其生长<sup>[5]</sup>。利用真菌提取物合成的银纳米颗粒也可抑制铜绿假单胞菌 QS 系统<sup>[6]</sup>。

哈夫尼亚菌属(*Hafnia* sp.)是一种革兰氏阴性杆菌,是导致真空包装和冷藏肉制品的腐败的主要腐败菌之一。相关研究表明哈夫尼亚菌的致腐能力受到以 N-酰基-L-高丝氨酸内酯(N-acyl-L-homoserine lactones, AHLs)为信号分子的群体感应系统调控,其中生物被膜、蛋白酶和胞外多糖等与腐败相关的毒力因子产生都受到 QS 系统影响<sup>[7-8]</sup>。目前银纳米颗粒对哈夫尼亚菌的抑制和对其 QS 系统的影响还不十分清楚。

常用银纳米颗粒合成方法有物理、化学和生物合成法。部分物理和化学合成方法有容易造成污染并且纳米颗粒成核速率难以控制等缺点。近年研究发现大量植物提取物中富含多糖、多酚和类黄酮类等还原性物质,可用来辅助合成具有抗菌功能的纳米颗粒,具有易于操作并对环境没有污染等优势<sup>[9-11]</sup>。蒲公英(Dandelion)作为一种药用植物广泛分布于东北亚地区,其提取物含有菊糖、醇类、碱类和多种维生素等活性成分<sup>[12]</sup>,可用于纳米颗粒的合成。本研究采用蒲公英植物提取物为还原剂,以 AgNO<sub>3</sub> 为银源,采用水热法合成蒲公英-银纳米颗粒(D-AgNPs),并对其结构、抗菌特

收稿日期: 2023-03-01

基金项目: 国家重点研发计划专项(2019YFD0901702)

第一作者: 檀茜倩,女,博士,讲师

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

性进行分析,研究其对哈夫尼亚菌 QS 系统(包括生物被膜、AHLs、蛋白酶、群集和泳动等毒力因子)的影响。本研究对基于银纳米颗粒的腐败菌控制技术开发有一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与培养基

哈夫尼亚菌(*Hafnia* sp.)HA1、HA2 为本实验室从冷藏腐败三文鱼中分离保藏。报告菌株为紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*, CV026),培养时需添加 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素。群集培养基(NaCl 5 g/L、琼脂 6 g/L、葡萄糖 5 g/L、蛋白胨 10 g/L);泳动培养基(NaCl 5g/L、琼脂 3 g/L、胰蛋白胨 10 g/L)。

### 1.2 主要试剂

蒲公英植物提取物,天健绿源植物草本荟;硝酸银、氯化钠、冰醋酸、无水碳酸钠、三氯乙酸、浓盐酸、浓硫酸、氢氧化钾、氢氧化钠,福晨(天津)化学试剂有限公司;LB 肉汤、LB 营养琼脂、琼脂粉、胰蛋白胨、蛋白胨,北京奥博星生物技术有限责任公司;三氯化铁、结晶紫,麦克林生化科技有限公司;碘、碘化铍钾、茆三酮、一水葡萄糖、福林酚,阿拉丁试剂有限公司;硫酸亚铁、酪蛋白,BBI 试剂公司;硫酸卡那霉素、PBS,索莱宝生物科技有限公司;戊二醛固定液,罗恩化学技术有限公司。

### 1.3 主要仪器与设备

BSA2245 型精密电子天平,德国 Sartorius 公司;LDZX-75KBS 型立式高压蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械有限公司;HZQ-X300C 型恒温振荡器、BPS-100CA 型恒温恒湿培养箱,上海一恒科技有限公司;洁净工作台,德国 Airtech 公司;Biofuge Stratos 型冷冻高速离心机,美国 Thermo 公司;DF-101S 集热式磁力搅拌器,杭州旌斐仪器科技有限公司;UV-2550 型紫外可见分光光度计,日本 Shimadzu 公司;90Plus Zeta 粒度及电位分析仪,美国 Brookhaven 公司;X 射线粉末自动衍射仪,日本 Rigaku 公司;S-4800 型场发射扫描电镜,日本 Hitachi 公司;Nikon Eclipse Ti 100 型光学显微镜,日本 Nikon 公司;Scimitar 2000 FT-IR 型红外分光光度计,美国 Agilent 公司;Nano-ZS90 激光粒度仪,英国 Malvern 公司。

## 1.4 试验方法

1.4.1 蒲公英植物提取物的主要成分分析 为测定蒲公英植物提取物中是否含有生物碱、糖苷、多酚、黄酮、蒽醌、蛋白和氰苷类物质分别进行如下试验。称取 0.2 g 蒲公英植物提取物溶于 30 mL 蒸馏水中,将 10 mL Dragendorff 试剂与 2 mL 蒲公英提取液混匀煮沸,同时滴加 Wagner 试剂于 2 mL 蒲公英提取液,根据是否出现棕色沉淀判断其是否含有生物碱;1 mL Keller Killani 试剂与 2 mL 蒲公英提取液混匀,再加入 5 mL 浓  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,根据溶液是否呈蓝色判断其是否含有糖苷;2 mL  $\text{FeCl}_3$  溶液与 1 mL 蒲公英提取液混匀,观察溶液是否呈蓝绿色判断其是否含有多酚;1 mL 10% NaOH 与 1 mL 蒲公英提取液混匀,滴入稀 HCl 观察溶液是否呈黄色判断其是否含有黄酮;1 mL 10% KOH 与 1 mL 蒲公英提取液混匀,观察溶液是否呈紫红色判断其是否含有蒽醌;1 mL 0.2% 茆三酮溶液与 1 mL 蒲公英提取液混匀于 70  $^{\circ}\text{C}$  加热,观察溶液是否呈紫色判断蛋白物质的存在;1 mL 蒲公英提取液中加入 1 mL 10% NaOH 于 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴 10 min,然后依次加入 10%  $\text{FeSO}_4$ 、10% HCl 和 5%  $\text{FeCl}_3$  各 1 mL 并根据溶液是否呈蓝色判断氰苷物质的存在<sup>[10,13]</sup>。

1.4.2 D-AgNPs 的合成和表征 称取 0.2 g 蒲公英植物提取物溶于 30 mL 蒸馏水中与 10 mL 的  $\text{AgNO}_3$  (10 mmol/L)混匀后,于避光条件下采用水热法在 30, 60  $^{\circ}\text{C}$  和 100  $^{\circ}\text{C}$  温度下磁力搅拌 6 h,溶液变为黑褐色表明银纳米颗粒合成。于 12 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心 45 min,获得的沉淀为 D-AgNPs,沉淀用 10 mL 无菌水于相同条件下洗涤 3 次后冻干保存。

采用紫外-可见分光光度计测定 D-AgNPs 的特征吸收光谱,将一定量冻干的 D-AgNPs 重新溶解于 10 mL 无菌水在 300~600 nm、扫描频率 1.0 Hz 条件下扫描<sup>[14]</sup>;采用动态光散射(25  $^{\circ}\text{C}$ 、入射波长 633 nm、散射角 90 $^{\circ}$ )测定 D-AgNPs 的粒径分布<sup>[15]</sup>,Zeta 电位仪测定 D-AgNPs 的稳定性<sup>[16]</sup>;采用 X 射线衍射仪测定 D-AgNPs 的晶体特性,粒子大小采用公式(1)的德拜-谢乐(Debye-Scherrer)公式计算:

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (1)$$

式中:  $K$ ——谢乐常数 (0.9);  $\lambda$ ——X 射线波长 (0.15406 nm);  $\beta$ ——衍射峰半高宽度;  $\theta$ ——布拉格衍射角。采用 FTIR 测定 D-AgNPs 中的活性基团, 将冻干的 D-AgNPs 与溴化钾混合压片在 500~4 000  $\text{cm}^{-1}$  范围内扫描获得 D-AgNPs 的傅里叶变换红外光谱图; 采用扫描电镜 (1.0~2.0 kV、10 mA) 测定 D-AgNPs 形貌, X 射线能谱仪 (EDS) 进行元素分析。X 射线衍射图谱和傅里叶变换红外光谱图采用 MDI Jade 6 软件和 Omnic 软件进行平滑处理并去除背景噪声<sup>[17]</sup>。

1.4.3 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌的最小抑菌浓度 采用牛津杯平板法测定 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌的抑菌能力, 微量肉汤稀释法测定 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。

1.4.4 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌生物被膜形成的影响 为了测定 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌生物被膜形成的影响将菌株 HA1 和 HA2 按体积分数 1% 接种于含 200  $\mu\text{L}$  LB 肉汤的 96 孔板中同时添加 1/128~1/2 MIC 浓度的 D-AgNPs 培养 24 h, 吸去菌液, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 风干后用 200  $\mu\text{L}$  0.1% 结晶紫溶液染色 15 min, 后吸去染色液用 PBS 缓冲液洗涤至无紫色, 风干后用 200  $\mu\text{L}$  33% 冰醋酸溶解染液 15 min 并测定  $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$  值, 对照组未加入 D-AgNPs, 每组 6 个平行, 按照公式 (2) 计算 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌生物被膜形成的抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{D-AgNPs 处理}}}{\text{OD}_{\text{对照}}} \times 100 \quad (2)$$

同时在光学显微镜和扫描电镜下观察不同浓度 D-AgNPs 对生物被膜形成的影响。

1.4.5 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌产 AHLs 信号分子的影响 根据 CV026 产紫情况可以在一定程度上反应溶液中 AHLs 信号分子的活性, 以 CV026 作为报告菌株, 通过牛津杯法测定不同浓度 D-AgNPs 处理下哈夫尼亚菌培养 24 h 后获得的无细胞提取物, 通过 CV026 在培养 24 h 产生的紫色圈的大小来评价 D-AgNPs 对 AHLs 信号分子的

影响。具体操作为, 将 HA1 和 HA2 ( $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$  为 0.5 左右) 按体积分数 1% 接种于含 1/128~1/2 MIC 浓度的 D-AgNPs 的 10 mL LB 肉汤中培养 24 h 后, 于 8 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心 2 min, 取 200  $\mu\text{L}$  上清液注入经牛津杯打孔的含有 CV026 的 LB 营养琼脂, 培养 24 h 后测定紫色圈直径, 每组 3 个平行, 对照组未加入 D-AgNPs。

1.4.6 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌蛋白酶活性和产胞外多糖的影响 以酪蛋白为底物采用福林酚法测定 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌胞外蛋白酶活力的影响。参照 Zou 等<sup>[18]</sup>的方法并稍作修改, 将哈夫尼亚菌 HA2 ( $\text{OD}_{595 \text{ nm}}=0.5$ ) 按体积分数 1% 接种于含 1/128~1/2 MIC 浓度的 D-AgNPs 的 10 mL LB 肉汤中培养 24 h 后, 于 8 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心 2 min 获得上清液即粗酶液, 取 1 mL 粗酶液于 28  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min, 预热后加入 2 mL 0.5% 酪蛋白溶液反应 10 min, 后加入 3 mL 10% 三氯乙酸溶液终止反应 15 min。将反应液于 12 000 r/min、28  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心 10 min, 取 1 mL 上清液、5 mL 0.55 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液混匀后加入 1 mL 福林酚试剂, 显色 15 min 后测定  $\text{OD}_{680 \text{ nm}}$  值。将哈夫尼亚菌 HA2 的蛋白酶活力定义为在 28  $^{\circ}\text{C}$  时, 1 mL 粗酶液 1 min 水解酪蛋白产生 1  $\mu\text{g}$  酪氨酸为 1 个酶活力单位, 酶活力按公式 (3) 计算:

$$\text{酶活力}(\text{U/mL}) = (\text{OD}_{680 \text{ nm}} \times K \times V) / (t \times N) \quad (3)$$

式中:  $\text{OD}_{680 \text{ nm}}$ ——样品的  $\text{OD}_{680 \text{ nm}}$  值;  $K$ ——标准曲线  $\text{OD}_{680 \text{ nm}}$  为 1 时酪氨酸的含量,  $\mu\text{g}$ ;  $t$ ——酶促反应时间 (10 min);  $V$ ——酶促反应总体积 (6 mL);  $N$ ——粗酶液的稀释倍数。

采用苯酚-硫酸法测定 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 胞外多糖生成量的影响。

1.4.7 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌群集和泳动能力的影响 采用群集和泳动培养基测定 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌群集和泳动的影响。将 4  $\mu\text{L}$  HA1 和 HA2 菌液 ( $\text{OD}_{595 \text{ nm}}$  为 0.5 左右) 点种于含 1/128~1/2 MIC 不同 D-AgNPs 的群集和泳动培养基中心, 待其风干后于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后测量其迁移直径。

1.4.8 统计分析 采用 Excel、SPSS 26 软件对数据进行处理和统计学分析, 采用 Origin 2018 作图。



## 2 结果与分析

### 2.1 蒲公英植物提取物的成分分析

蒲公英广泛分布于北半球,因其富含多种生物碱、多酚及萜类等活性物质,所以具有消炎、降糖、抗癌和抗氧化等多种功能<sup>[19]</sup>。通过对本研究所采用蒲公英植物提取物的成分分析发现其活性成分以生物碱、多酚和甾苷为主(表 1),这部分物质在 AgNPs 的合成过程中可起到还原剂、封端剂作用<sup>[19]</sup>,因此蒲公英植物提取物可作为银纳米颗粒合成的一种绿色生物试剂。

### 2.2 D-AgNPs 的合成和表征

蒲公英植物提取物在 60 °C 与 AgNO<sub>3</sub> 进行水热反应合成 6 h 后溶液颜色由棕黄变为黑褐色(图 1a),表明 AgNPs 的形成。后通过 UV-vis(300~600 nm)分析发现溶液在 431 nm 处具有吸收共振峰(图 1b),相关研究表明 380~460 nm 之间的表

表 1 蒲公英植物提取物中的活性成分

Table 1 The active ingredients of dandelion plant extract

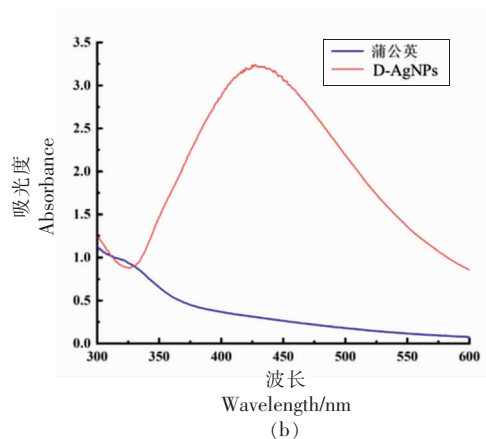
生物活性成分	蒲公英
生物碱	+
糖苷	-
多酚	+
黄酮	-
萜醌	-
蛋白质	-
甾苷	+

注:“+”表示变色;“-”表示未变色。

面等离子共振峰是 AgNPs 的特有吸收共振峰<sup>[20]</sup>,进一步证实了 D-AgNPs 的形成,因其吸收峰较宽推测本研究所合成 D-AgNPs 为多分散性胶体溶液。



(a)



(b)

图 1 蒲公英植物提取物合成的 D-AgNPs 及其紫外-可见吸收光谱图

Fig.1 Dandelion extract mediated biosynthesis of D-AgNPs and its UV-vis absorption spectra

采用动态光散射 (Dynamic Light Scattering, DLS) 数量分布测定 D-AgNPs 的粒径大部分小于 100 nm(图 2a),平均多分散性指数 (Polydispersity index, PDI) 为 0.338, Zeta 电位为 (-14.07±0.25) mV,其形成与蒲公英植物提取物中的多酚物质作为封端剂有关<sup>[21]</sup>,负电荷形成有利于 AgNPs 与致病细菌细胞膜上的疏基蛋白结合发挥抑菌作用,同时可与细胞膜间形成排斥力以减弱 AgNPs 的细胞毒性<sup>[22-23]</sup>。

D-AgNPs 的 XRD 图如图 3 所示。证实其为面心立方结构,2θ 值与数据库比对出现 AgCl 衍

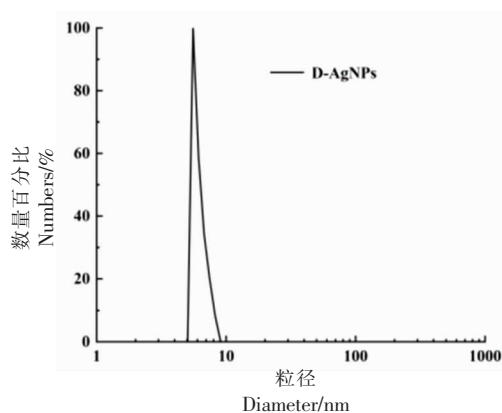


图 2 D-AgNPs 的 DLS 图

Fig.2 The DLS D-AgNPs

射峰 (PDF#85-1355), 同时在数值为  $27.82^\circ$ ,  $32.22^\circ$ ,  $46.2^\circ$ ,  $54.82^\circ$ ,  $57.48^\circ$ ,  $67.38^\circ$ ,  $74.42^\circ$ ,  $76.64^\circ$  时分别与 111, 200, 220, 311, 222, 400, 331, 420 晶面对应。AgCl 衍射峰出现表明蒲公英植物提取物中某种含氯化合物或 Cl<sup>-</sup> 参与了 Ag<sup>+</sup> 的还原<sup>[24-25]</sup>。通过德拜-谢乐 (Debye-Scherrer) 公式计算 D-AgNPs 平均晶体尺寸为 13.9 nm, 与 DLS 获得的粒径尺寸略微存在一定差异, 可能由于 D-AgNPs 的多晶体结构使得通过公式计算的尺寸与真实尺寸存在差异, 或是因为蒲公英中某些活性物质对 XRD 结

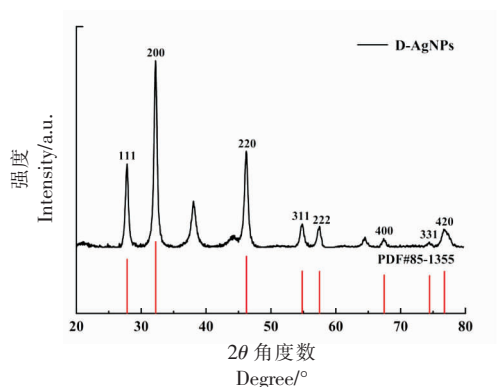
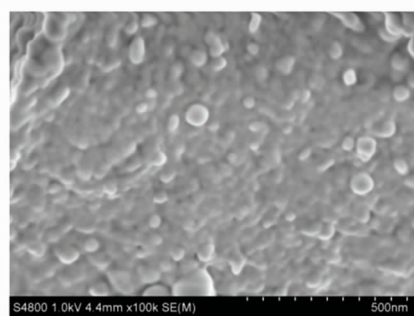


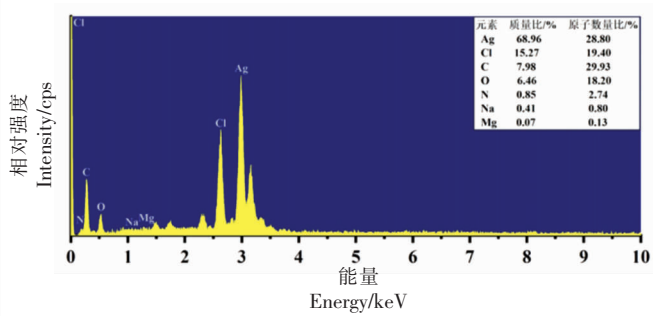
图3 D-AgNPs的XRD衍射图谱

Fig.3 X-ray diffraction analysis of D-AgNPs

进一步通过 SEM 观察 D-AgNPs 表面形貌发现其微观结构为球形, 粒径大小不均匀 (图 5a), 有部分团聚现象, 表明 D-AgNPs 粒径大小受到合成底物浓度、温度、成核速率以及是否发生团聚的影响<sup>[5]</sup>。通过 EDS 能谱分析 (图 5b), 在 3 keV 附近处



(a)



(b)

图5 D-AgNPs的扫描电镜(a)和X射线能谱分析(b)图

Fig.5 The SEM (a) and EDS (b) spectrum of D-AgNPs

果存在影响有关<sup>[26-27]</sup>。

FT-IR 光谱图如图 4 所示。在  $3423.97\text{ cm}^{-1}$  处为 O-H 拉伸,  $2923.50\text{ cm}^{-1}$  处为 C-H 弯曲,  $1637.23\text{ cm}^{-1}$  处为 N-H 弯曲,  $1404.01\text{ cm}^{-1}$  为 C-N 伸缩,  $650\sim 1350\text{ cm}^{-1}$  的指纹区出现的振动峰较多,  $1150.54, 1078.32, 1028.80\text{ cm}^{-1}$  处推测为 C-O 或 N-H 伸缩,  $575.87\text{ cm}^{-1}$  处为 C-Cl 伸缩。这些结果表明蒲公英植物提取物中酚类等化学物质与纳米颗粒的表面发生了交联<sup>[28-30]</sup>。

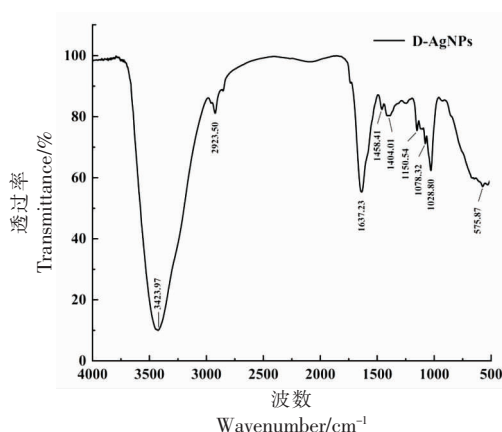


图4 D-AgNPs的傅里叶变换红外光谱图

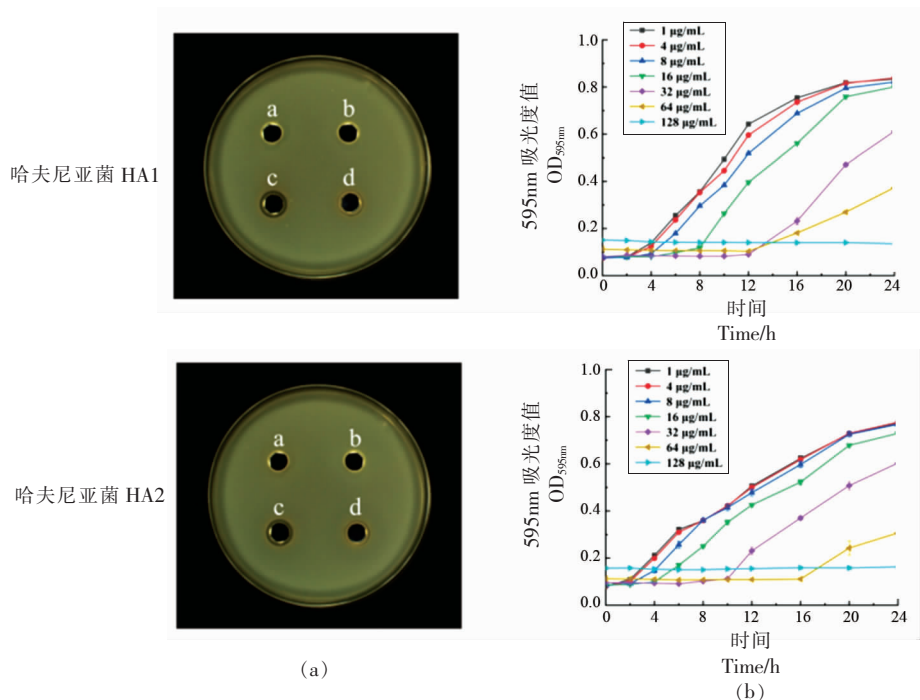
Fig.4 Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) spectrum of D-AgNPs

出现 Ag 强信号峰, Ag (68.96%) 和 Cl (15.27%) 这两种元素占据了前两位, 其次为 C (7.98%)、O (6.46%) 以及少量 (1% 以下) 的 N、Na 和 Mg, 这些与纳米颗粒结合的元素主要来自 AgNO<sub>3</sub> 以及蒲公英植物提取物中活性物质。

### 2.3 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌的抑菌能力分析

通过牛津杯平板法发现使用 D-AgNPs 相对于单独采用蒲公英植物提取物和 AgNO<sub>3</sub> 处理, D-AgNPs 在接种哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 平板上有

明显抑菌圈(图 6a), 证实 D-AgNPs 具有抑制哈夫尼亚菌的作用。96 孔板微量肉汤稀释法测定 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 的 MIC 为 128 μg/mL(图 6b)。



注:图 a 中 a:蒲公英提取物;b:无菌水;c:D-AgNPs;d:AgNO<sub>3</sub>。

图 6 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌抑菌能力(a)和对其生长(b)的影响

Fig.6 The inhibition activities of D-AgNPs on *Hafnia* sp.(a) and its impact on the growth of *Hafnia* sp. (b)

### 2.4 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌 AHL 型 QS 系统调控的毒力行为的影响

2.4.1 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌生物被膜形成的影响 D-AgNPs 质量浓度为 1/128~1/2 MIC (1~64 μg/mL)下对哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 生物被膜形成的影响如图 7a 所示,发现在终质量浓度 1/16~1/2 MIC (8~64 μg/mL)时 D-AgNPs 可抑制哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 生物被膜的形成,在 1/2 MIC (64 μg/mL) 时抑制率最高分别为 55.91%和 52.13%;1/4 MIC (32 μg/mL) 时抑制率分别为 50.54%和 42.55%;1/16 MIC (8 μg/mL)时最低,抑制率分别为 30.11%和 10.64%;而在更低质量浓度即 1/128~1/32 MIC (1~4 μg/mL)下 D-AgNPs 会对哈夫尼亚菌生物被膜的形成产生促进作用。接近 MIC 下 D-AgNPs 可以通过破坏细菌细胞膜完整性、降低 ATP 酶活性以及破坏生物被膜形成

机制来抑制其生物被膜的形成<sup>[31-32]</sup>。而较低浓度处理可能因为 D-AgNPs 中 Ag<sup>+</sup>的释放促进了 Ag<sup>+</sup>与生物被膜中的某些基团络合,进而促进生物被膜形成<sup>[33-34]</sup>,亦或是因为 1/128~1/32 MIC 时 D-AgNPs 上调了 QS 相关基因表达,提高了磷酸盐和胞外聚合物(胞外多糖)等的分泌<sup>[35]</sup>,进而促进生物被膜形成。

在光学显微镜和扫描电镜下观察 1/2 MIC (64 μg/mL) D-AgNPs 处理时哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 生物被膜结构(图 7b、7c),发现未有大面积完整生物被膜形成,而空白对照组则形成致密完整的生物被膜。

2.4.2 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌产 AHLs 信号分子的影响 1/128~1/2 MIC (1~64 μg/mL)质量浓度下 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 产生 AHLs 影响如图 8 所示。其可以对哈夫尼亚菌 HA1

和 HA2 中 AHLs 的产生起到抑制作用, 且与 D-AgNPs 浓度呈现正相关, D-AgNPs 在 1/2 MIC

(64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 时对 CV026 产紫的抑制率最高, 分别为 13.44% 和 14.30%。

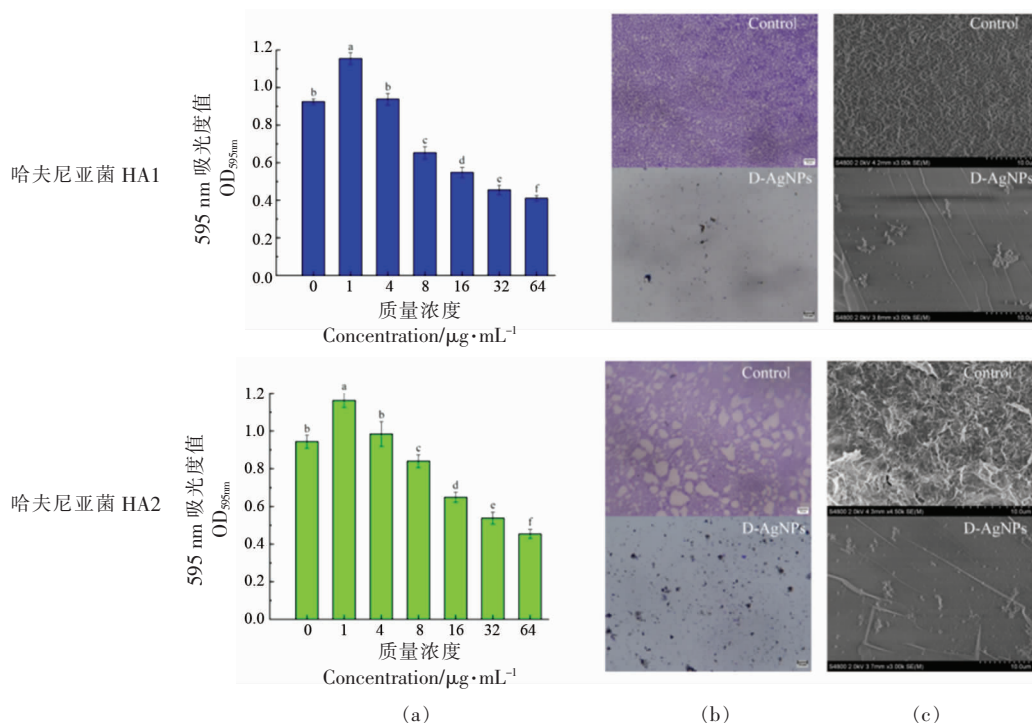


图7 不同浓度 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 生物被膜形成的影响 (a) 以及在 1/2 MIC (64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) D-AgNPs 处理下光学显微镜 (b) 和扫描电镜 (c) 下的生物被膜形态

Fig.7 The effect of D-AgNPs on biofilm formation of *Hafnia* sp. HA1 and HA2 (a), the morphologies of the biofilm under optical microscope (b) and scanning electron microscope (c) treated with 1/2 MIC (64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) D-AgNPs

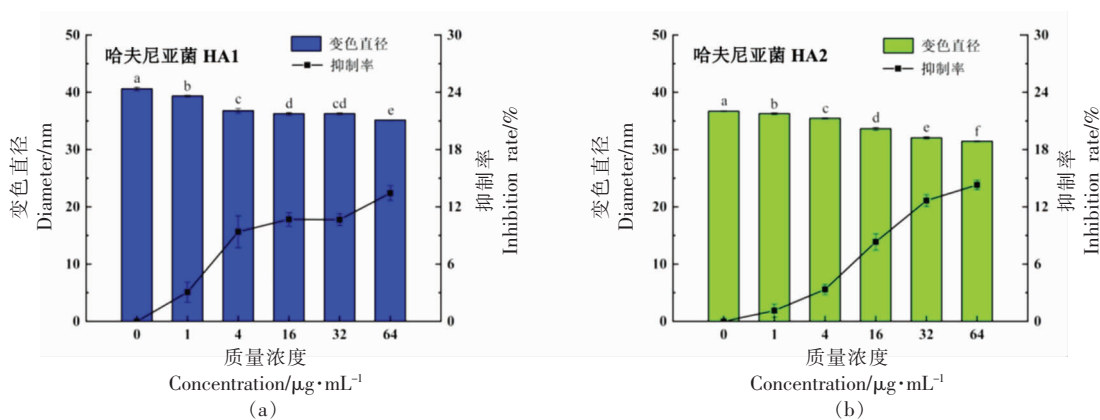


图8 不同浓度 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 产 AHLs 的影响

Fig.8 The effect of D-AgNPs on AHLs production of *Hafnia* sp. HA1 and HA2

2.4.3 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌胞外蛋白酶活性和胞外多糖产量的影响 因本研究中菌株 HA1 不具备产蛋白酶能力, 故以酪蛋白为底物采用福林酚

法测定 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌 HA2 胞外蛋白酶活力的影响, 结果如图 9a。研究发现 1/128~1/2 MIC (1~64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 浓度的 D-AgNPs 可抑制其产



蛋白酶活性,抑制率随浓度增大而增高,在 1/2 MIC (64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )时抑制率最高为 52.11%。

通过苯酚-硫酸法测定 1/128~1/2 MIC (1~64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 质量浓度下 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌胞外多糖产量影响的结果如图 9b 所示,可以看出 D-AgNPs 处理对哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 胞外多糖生成略有促进,在 1/2 MIC (64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 处理时哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 的胞外多糖产量最大分别为 67.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 66.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,相较于不添加 D-AgNPs 的空白对照组胞外多糖产量分别增加了

19.70%和 16.52%。此现象产生原因可能与 D-AgNPs 使某些转录调节因子去磷酸化影响了胞外多糖表达的级联反应有关,有研究表明纳米  $\text{TiO}_2$  可通过抑制转录调节因子 CsgD 的磷酸化从而提高了生物被膜胞外多糖的表达<sup>[36]</sup>;也可能与细菌进入自我保护状态,即通过不生长或缓慢生长并产生大量胞外多糖来获得对压力环境的耐受性有关<sup>[37]</sup>,但哈夫尼亚菌对 D-AgNPs 耐受阈值大小还有待进一步研究证实。

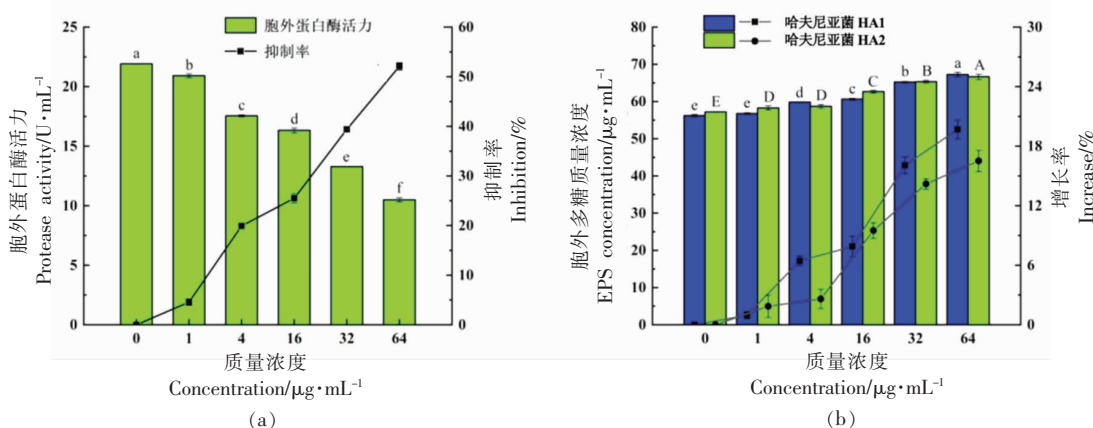


图 9 不同浓度 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌 HA2 胞外蛋白酶活性(a)和哈夫尼亚菌 HA1、HA2 胞外多糖产量(b)的影响  
Fig.9 Effects of D-AgNPs on the extracellular protease activity of *Hafnia* sp. HA2 (a) and the exopolysaccharides production of *Hafnia* sp. HA1 and HA2 (b)

2.4.4 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌群集和泳动能力的抑制情况分析 群集和泳动是与 QS 相关的毒力因子,也在生物被膜的形成中起到了重要作用。1/128~1/2 MIC (1~64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 质量浓度下 D-Ag-

NPs 对哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 的群集和泳动的影响如图 10a、10b 所示。D-AgNPs 对于哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 的群集能力抑制作用明显且随浓度增加而增强,但对两株菌的抑制能力略有差异,

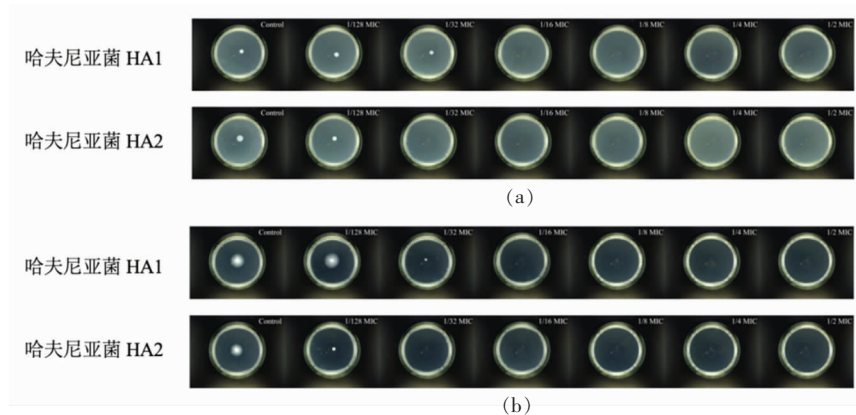


图 10 不同浓度 D-AgNPs 对哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 群集(a)和泳动(b)的抑制效果  
Fig.10 The effect of D-AgNPs on swarming (a) and swimming (b) motility of *Hafnia* sp. HA1 and HA2



在 1/32 MIC (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 时即可抑制哈夫尼亚菌 HA2 的群集能力,而对于哈夫尼亚菌 HA1 则需在 1/16 MIC (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 质量浓度下。D-AgNPs 对于哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 泳动能力的抑制与对群集能力抑制效果类似,在 1/32 MIC (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 时抑制哈夫尼亚菌 HA1 和 HA2 的泳动能力。

### 3 结论

采用蒲公英植物提取物成功合成具有抑菌能力的球形 D-AgNPs, 确定其对两种哈夫尼亚菌的 MIC 为 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在 sub-MIC 浓度下 D-AgNPs 可干预哈夫尼亚菌 QS 系统, 调控生物被膜、AHLs、蛋白酶、胞外多糖、群集和泳动等毒力因子的形成;D-AgNPs 对生物被膜的影响与浓度有关, 高 sub-MIC 浓度可以抑制生物被膜形成, 低 sub-MIC 下反而会促进生物被膜的生长;D-AgNPs 也可以在一定程度上抑制 AHLs、胞外蛋白酶、群集和泳动等毒力因子的形成, 但对胞外多糖的产生有一定促进。D-AgNPs 干扰哈夫尼亚菌 QS 系统的相应机制还需要进一步研究证实。

### 参 考 文 献

- [1] LU J, ZHANG S, GAO S H, et al. New insights of the bacterial response to exposure of differently sized silver nanomaterials[J]. *Water Research*, 2020, 169: 115205.
- [2] LIU L, LI J H, ZI S F, et al. AgNP combined with quorum sensing inhibitor increased the antibiofilm effect on *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(15): 6195-6204.
- [3] BAI A J, RAI V R. Bacterial quorum sensing and food industry[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2011, 10(3): 183-193.
- [4] ABISADO R G, BENOMAR S, KLAUS J R, et al. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions[J]. *MBio*, 2018, 9(3): e02331-17.
- [5] QAIS F A, SHAFIQ A, AHMAD I, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Carum copiticum*: Assessment of its quorum sensing and biofilm inhibitory potential against gram negative bacterial pathogens[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 144: 104172.
- [6] AKTHER T, KHAN M S, S. H. Biosynthesis of silver nanoparticles via fungal cell filtrate and their anti-quorum sensing against *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2020, 8(6): 104365.
- [7] MACÉ S, JOFFRAUD J J, CARDINAL M, et al. Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (*Salmo salar*) fillets stored under modified atmosphere packaging[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 160(3): 227-238.
- [8] LI T T, HE B B, MEI Y C, et al. Inhibitory effect of vanillin on the virulence factors and biofilm formation of *Hafnia alvei*[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2019, 102: 223-229.
- [9] FANORO O T, OLUWAFEMI O S. Bactericidal antibacterial mechanism of plant synthesized silver, gold and bimetallic nanoparticles[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(11): 1044.
- [10] SARASWATHI V S, KAMARUDHEEN N, BHASKARARAO K V, et al. Phytoremediation of dyes using *Lagerstroemia speciosa* mediated silver nanoparticles and its biofilm activity against clinical strains *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2017, 168: 107-116.
- [11] DAS P, KARANKAR V S. New avenues of controlling microbial infections through anti-microbial and anti-biofilm potentials of green mono- and multi-metallic nanoparticles: A review[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2019, 167: 105766.
- [12] LIS B, OLAS B. Pro-health activity of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) and its food products - history and present[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 59: 40-48.
- [13] PATHAK M, KUMAR V, PATHAK P, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Scindapsus officinalis* (Gajjipili): *In-vitro* cytotoxic activity against HepG-2 & MCF-7 cancer cell lines[J/OL]. *Preprints*, (2019-08-13)[2022-11-30]. <https://doi.org/10.20944/preprints201908.0118.v1>.
- [14] LIAO S J, ZHANG Y P, PAN X P, et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *International Journal of Nanomedicine*,

- 2019, 14: 1469–1487.
- [15] AULT A P, STARK D I, AXSON J L, et al. Protein corona-induced modification of silver nanoparticle aggregation in simulated gastric fluid[J]. *Environmental Science: Nano*, 2016, 3(6): 1510–1520.
- [16] HASHIM N, PARAMASIVAM M, TAN J S, et al. Green mode synthesis of silver nanoparticles using *Vitis vinifera*'s tannin and screening its antimicrobial activity/apoptotic potential versus cancer cells[J]. *Materials Today Communications*, 2020, 25: 101511.
- [17] YU Z L, WANG W, KONG F B, et al. Cellulose nanofibril/silver nanoparticle composite as an active food packaging system and its toxicity to human colon cells [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 129: 887–894.
- [18] ZOU Y, ROBBENS J, HEYNDRIKX M, et al. Quantification of extracellular proteases and chitinases from Marine bacteria [J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(12): 3927–3936.
- [19] MIRZA A U, KAREEM A, NAMI S A A, et al. Biogenic synthesis of iron oxide nanoparticles using *Agrawaloptiva* and *Prunus persica* phyto species: Characterization, antibacterial and antioxidant activity [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2018, 185: 262–274.
- [20] KHAN F, HASHMI M U, KHALID N, et al. Controlled assembly of silver nano-fluid in *Heliotropium crispum* extract: A potent anti-biofilm and bactericidal formulation [J]. *Applied Surface Science*, 2016, 387: 317–331.
- [21] SINGH R, HANO C, NATH G, et al. Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Carissa carandas* L. and their antioxidant and antimicrobial activity against human pathogenic bacteria [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(299): 299.
- [22] JAIN A, AHMAD F, GOLA D, et al. Multi dye degradation and antibacterial potential of Papaya leaf derived silver nanoparticles [J]. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 2020, 14: 100337.
- [23] GONÇALVES K DE O, VIEIRA D P, LEVY D, et al. Uptake of silver, gold, and hybrids silver-iron, gold-iron and silver-gold aminolevulinic acid nanoparticles by MCF-7 breast cancer cells[J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2020, 32: 102080.
- [24] PEREIRA T M, POLEZ V L P, SOUSA M H, et al. Modulating physical, chemical, and biological properties of silver nanoparticles obtained by green synthesis using different parts of the tree *Handroanthusheptaphyllus* (Vell.) Mattos[J]. *Colloid and Interface Science Communications*, 2020, 34: 100224.
- [25] SUN A D, XU Q C, XU S J, et al. Separation and analysis of chlorine isotopes in higher plants[J]. *Chemical Geology*, 2014, 381: 21–25.
- [26] PATIL R B, CHOUGALE A D. Analytical methods for the identification and characterization of silver nanoparticles: A brief review [J]. *Materials Today: Proceedings*, 2021, 47: 5520–5532.
- [27] CHAND K, CAO D, FOUAD D E, et al. Photocatalytic and antimicrobial activity of biosynthesized silver and titanium dioxide nanoparticles: A comparative study[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 316: 113821.
- [28] TAMILARASI P, MEENA P. Green synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) using *Gomphrena globosa* (*Globe amaranth*) leaf extract and their characterization [J]. *Materials Today: Proceedings*, 2020, 33: 2209–2216.
- [29] CALDERÓN-AYALA G, CORTEZ-VALADEZ M, MARTÍNEZ-NÚÑEZ C E, et al. FLG/silver nanoparticles: Nanocomposite by green synthesis[J]. *Diamond and Related Materials*, 2020, 101: 107618.
- [30] YOUSAF H, MEHMOOD A, AHMAD K S, et al. Green synthesis of silver nanoparticles and their applications as an alternative antibacterial and antioxidant agents[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, 112: 110901.
- [31] BARABADI H, MOJAB F, VAHIDI H, et al. Green synthesis, characterization, antibacterial and biofilm inhibitory activity of silver nanoparticles compared to commercial silver nanoparticles[J]. *Inorganic Chemistry Communications*, 2021, 129: 108647.
- [32] ABELEDA H E P, JAVIER A P, MURILLO A Q M, et al. Alpha-amylose conjugated biogenic silver nanoparticles as innovative strategy against biofilm-forming multidrug resistant bacteria [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2020, 29: 101784.
- [33] SHI N, GAO Y T, YIN D H, et al. The effect of the sub-minimal inhibitory concentration and the concentrations within resistant mutation window of

- ciprofloxacin on MIC, swimming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2019, 137: 103765.
- [34] SU G R, DENG X T, ZHONG H, et al. Ag<sup>+</sup> significantly promoted the biofilm formation of thermoacidophilic archaeon *Acidianus manzaensis* YN-25 on chalcopyrite surface[J]. *Chemosphere*, 2021, 276: 130208.
- [35] YANG Y, ALVAREZ P J J. Sublethal concentrations of silver nanoparticles stimulate biofilm development[J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2015, 2(8): 221–226.
- [36] ZHU J, WANG J, CHEN Y P, et al. Quantitative proteomics and phosphoproteomics elucidate the molecular mechanism of nanostructured TiO<sub>2</sub>-stimulated biofilm formation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 432: 128709.
- [37] LIU S, CAO S, GUO J, et al. Graphene oxide-silver nanocomposites modulate biofilm formation and extracellular polymeric substance (EPS) production [J]. *Nanoscale*, 2018, 10(41): 19603–19611.

### The AHL Quorum Sensing Inhibitory Potential of Dandelion–Ag Nanoparticles Against Salmon–originated *Hafnia* sp.

Tan Xiqian<sup>1,2</sup>, Pei Jianbo<sup>1</sup>, Wang Xiaqing<sup>1</sup>, Cui Fangchao<sup>1</sup>, Meng Yuqiong<sup>3</sup>,  
Ma Rui<sup>3</sup>, Li Xuepeng<sup>1</sup>, Li Jianrong<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>*School of Food Science and Engineering/Institute of Marine Science and Technology, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning*

<sup>2</sup>*School of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457*

<sup>3</sup>*State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016*

**Abstract** Quorum sensing (QS) is a communication pattern between bacteria, hence the inhibition of bacterial QS system could be used as a new strategy to the control the spoilage caused by bacteria, and to some extent could avoid the bacteria drug resistance. In the study, dandelion water extract mediated biosynthesis Ag nanoparticles (D–AgNPs) was prepared with AgNO<sub>3</sub> as silver source and dandelion water extract as reducing agent. Its structure was characterized by ultraviolet visible absorption spectroscopy (UV–vis), dynamic light scattering (DLS), Zeta potential, X–ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM) and X–ray energy spectrum (EDS). It was found that the synthesized D–AgNPs were spherical, with an average particle size of 13.9 nm and Zeta potential of (–14.07±0.25) mV. The effects of D–AgNPs on the growth of two *Hafnia* strains and quorum sensing regulated virulence factors such as biofilm, AHLs, proteases, exopolysaccharides, swimming and swarming motilities were determined. It was found that the minimum inhibitory concentration of D–AgNPs against *Hafnia* was 128 µg/mL, and could inhibit the formation of the biofilms of *Hafnia* at 1/16~1/2 MIC (8–64 µg/mL), whereas promoted its biofilm formation at 1/128~1/32 MIC (1–4 µg/mL). D–AgNPs showed different inhibition abilities on the AHLs and protease production, as well as swimming and swarming motilities; however, sub–MIC D–AgNPs promoted the production of exopolysaccharides. It is proved that D–AgNPs could be used as quorum sensing inhibitor.

**Keywords** Ag nanoparticles; *Hafnia*; quorum sensing; green synthesis; salmon