

蜡样芽孢杆菌 YF-2 对荧光假单胞菌群体感应的淬灭活性

王扬蕊¹, 温馨¹, 白凤翎¹, 檀茜倩¹, 吕欣然^{1*}, 励建荣^{1,2}, 董浩³, 孟玉琼⁴,
马睿⁴, 王树林⁴, 应米燕⁵, 杨旭⁵

(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

辽宁省食品安全重点实验室 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

⁴青海大学 西宁 810016

⁵民泽龙羊峡生态水产有限公司 青海海南藏族自治州 811800)

摘要 荧光假单胞菌是生鲜水产品中常见的优势腐败菌,其致病能力受 *N*-酰基高丝氨酸内酯(AHLs)类群体感应系统调控。以群体感应淬灭活性为导向,利用热灭活和酸敏感试验分析菌株 YF-2 分泌的淬灭活性物质类型。采用结晶紫染色法和激光共聚焦显微镜技术探究菌株 YF-2 对荧光假单胞菌生物膜的抑制和清除作用。通过生理生化 and 16S rDNA 对菌株 YF-2 进行鉴定。结果表明:菌株 YF-2 对荧光假单胞菌 AHLs 具有较强的淬灭作用,降解率为 100%,且淬灭活性物质在细胞提取物(CCE)中,通过热灭活及酸敏感试验初步判断淬灭活性物质为酰基转移酶或氧化还原酶。蛋白质量浓度为 20,40 μg/mL 和 80 μg/mL 的 CCE 对 C₄-HSL、C₆-HSL 及 C₈-HSL 的降解率在 52.8%~100%范围,对荧光假单胞菌生物膜的抑制率和清除率分别在 25.84%~56.63%和 26.12%~59.35%范围。此外,激光共聚焦图像表明 CCE 使荧光假单胞菌生物膜厚度减少,生物膜结构被破坏。同时,菌株 YF-2 被鉴定为蜡样芽孢杆菌。本研究为应用芽孢杆菌控制水产品腐败菌荧光假单胞菌提供一定的理论依据。

关键词 群体感应; 蜡样芽孢杆菌; 荧光假单胞菌; 群体感应淬灭酶

文章编号 1009-7848(2024)08-0187-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.08.018

荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 作为一种典型嗜冷性细菌,是引起冷藏水产品腐败的优势腐败菌^[1]。其致病能力由 *N*-酰基高丝氨酸内酯(*N*-Homoserine lactone, AHLs)类信号分子介导的群体感应系统调控^[2]。研究表明,荧光假单胞菌蛋白酶的分泌、鞭毛的运动和生物膜的形成受 C₄-HSL、C₆-HSL、3-HO-C₄-HSL、3-HO-C₈-HSL 等 AHLs 信号分子的调控^[3-5]。群体感应系统成为控制荧光假单胞菌污染食品新的潜在靶点。

群体感应(Quorum sensing, QS)是一种广泛存在于微生物体内的细胞间通讯系统,细菌通过自身诱导物(Autoinducer, AI)的分泌、检测和反应,激活包括毒力机制和耐药机制在内的各种下游细胞过程,使其释放毒力因子,产生腐蚀性并耐

受抗生素从而损害宿主^[6]。群体感应淬灭(Quorum quenching, QQ)是指对细菌的群体感应系统进行干预,对菌落内及菌落间的通讯进行拦截,以及降低细菌毒素的产生及释放^[7-9]。研究表明,大多数群体感应抑制剂的作用模式是:1) 抑制细菌自身诱导物的合成;2) 对细菌产生的自身诱导物进行酶解;3) 与环境中的自身诱导物竞争受体的结合位点;4) 干扰自身诱导物与基因启动子的结合^[10]。考虑到群体感应抑制剂的效率和细菌的耐药性,群体淬灭酶被认为是目前最理想的群体感应抑制剂^[11]。

群体淬灭酶主要包括 AHLs 内酯酶、AHLs 酰基转移酶和氧化还原酶。Dong 等^[12]从芽孢杆菌 (*Bacillus*)240B1 中克隆出世界上第 1 个编码 AHLs 内酯酶基因 *aiiA*, 并发现内酯酶 AiiA 可以有效减弱软腐病相关病原菌的致病性。随后,大量研究表明编码酰基转移酶的基因广泛地存在于芽孢杆菌属中,如 Nithya 等^[13]在对海洋沉积物来源

收稿日期: 2023-08-02

基金项目: “十三五”国家重点研发计划重点专项
(2019YFD0901702)

第一作者: 王扬蕊,女,博士生

通信作者: 吕欣然 E-mail: lvxinran1990@163.com

的微生物进行QQ菌筛时,获得1株产AHLs酰基转移酶的短小芽孢杆菌S8-07,发现其对铜绿假单胞菌的信号分子的积累具有明显抑制作用,且能有效抑制铜绿假单胞菌和粘质沙雷氏菌毒力因子的表达。此外,巨大芽孢杆菌产生的AHLs氧化还原酶P450BM-3能催化AHLs裂解^[14]。目前关于具有群体感应淬灭活性芽孢杆菌的研究主要集中在防控植物致病菌方面,而其对水产品腐败菌荧光假单胞菌群体系统的淬灭作用及生物膜的抑制研究并不深入。

本文采用双层琼脂扩散法验证菌株YF-2对荧光假单胞菌的群体感应淬灭活性。通过热灭活和酸敏感试验分析淬灭活性物质类型。采用结晶紫定量法和激光共聚焦技术探究淬灭活性物质对荧光假单胞菌生物膜的抑制效果和清除作用。本文旨在从丰富的芽孢杆菌资源中寻找安全、高效的群体感应淬灭菌,研究其对荧光假单胞菌群体感应系统的淬灭效果,为控制水产腐败菌提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)YF-2,分离自辽宁朝阳泡菜;荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)分离自腐败大菱鲆;紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)CV0266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。以上菌株均保藏于本院微生物实验室。

琼脂粉、LB肉汤、LB固体,青岛海博生物技术有限公司;硫酸卡那霉素,上海碧云天生物技术有限公司;冰醋酸、乙酸乙酯、甲醇,北京伊诺凯科技有限公司;无水乙醇,山东普利斯化工厂;磷酸盐缓冲液、2.5%戊二醛,飞净生物科技有限公司;生理生化鉴定管,杭州微生物试剂有限公司;细菌基因组DNA快速抽提试剂盒、aq PCR Master mix、4S GelRed核酸染料、DNA marker-D,上海生工生物工程有限公司;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

BSA224S电子分析天平,德国sartorius集团;AZ8601便携pH计,台湾衡欣科技股份有限公司;ZX-400型全自动菌落计数仪,杭州泽析生物;JY92-IIDN超声破碎仪、Scientz-WSQ全自动微生物生长曲线分析仪,宁波新芝生物;PCR仪,德国Eppendorf公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司;凝胶成像系统、酶标仪,美国Bio-Rad公司;UV2550紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;Leica TCS SP5激光共聚焦显微镜,德国徕卡显微系统;GI54DS致微高校专用高压灭菌器,福建致微仪器有限公司;HealForceOptiClean1300洁净工作台,香港力康集团;SHP-360D生化培养箱,上海森信实验仪器有限公司;N-1300V-WB旋转蒸发仪,东京理化器械株式会社;LC-WB-4恒温水浴锅,力辰科技。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化 将菌株YF-2以2.0%(体积分数)接种于LB肉汤中,于37℃,24h条件下传代培养后使用。紫色杆菌CV026和荧光假单胞菌以1.0%(体积分数)接种于LB肉汤中,于30℃培养24h,传代培养3次。其中,紫色杆菌CV026培养时需于LB培养基中添加终浓度为34.33 μmol/L·d的卡那霉素。

1.3.2 荧光假单胞菌AHLs信号分子粗提物的制备 参考丁婷^[15]的方法,将荧光假单胞菌培养物于4℃,8000 r/min离心10 min,收集上清液,并用0.22 μm滤膜抽滤。取100 mL滤液于分液漏斗中,使用等体积含有0.01%冰醋酸的乙酸乙酯萃取,摇匀,静置5 min后萃取,收集乳化层液体,置于50℃、120 r/min条件下旋转蒸发,直至蒸发瓶中无乙酸乙酯气味,样品干燥。用体积分数70%的甲醇溶液溶解干燥物,得到荧光假单胞菌AHLs粗提物,存于-20℃冰箱备用。

1.3.3 菌株YF-2群体淬灭活性验证 参考Cui等^[16]的方法,将1 mL菌株YF-2的3代培养物(pH 7.0)与10 μL荧光假单胞菌AHLs粗提物混合,于30℃培养24 h,离心收集上清液。采用琼脂扩散法检测菌株YF-2的群体感应淬灭活性。

1.3.4 群体淬灭活性物质位置及类型确定 参考Torres等^[17]的方法并稍作修改,取40.0 mL菌株

YF-2 培养物于 4 ℃, 10 000 r/min 离心 5 min, 得无细胞上清液 (Cell free supernatants, CFS) 和菌体沉淀。菌体沉淀用 PBS (pH 6.5) 缓冲液洗涤 2 次后重悬于 10.0 mL PBS (pH 6.5) 中, 于冰水浴中 间歇超声破碎 5 min, 离心收集上清液, 上清液经 0.22 μm 滤膜过滤, 即菌株 YF-2 的细胞提取物 (Crude cell extract, CCE)。

取 1.0 mL 菌株 YF-2 菌悬液、CFS、CCE 和热灭活的 CCE (100 ℃ 灭活 30 min) 与 C₄-HSL (终浓度为 10 mmol/L) 混合, 于 30 ℃ 培养 24 h, 4 ℃, 10 000 r/min 离心 5 min, 收集共培养物上清液, 采用琼脂平板扩散法检测剩余 C₄-HSL 含量。以 PBS 为阴性对照, 未灭活的 CCE 为阳性对照。

参考 Romero 等^[18]的方法分析菌株 YF-2 分泌的淬灭活性物质类型。取 1.0 mL CCE 与 C₈-HSL (终浓度为 10 mmol/L) 混合, 于 30 ℃ 培养 24 h, 离心收集共培养物上清液, 采用琼脂平板扩散法检测剩余 C₈-HSL 含量。用 1.0 mol/L HCl 调节剩余共培养物上清液的 pH 值至 2.0, 30 ℃ 下培养 24 h 后, 调节混合物 pH 值至 7.0, 再用琼脂平板扩散法检测其 C₈-HSL 含量。

1.3.5 菌株 YF-2 对紫色杆菌 CV026 生长的影响

参考李欣蔚^[19]的方法测定菌株 YF-2CCE 的蛋白含量。将 2 代菌悬液稀释至 10⁶ CFU/mL, 取 180 μL 紫色杆菌 CV026 (10⁶ CFU/mL) 菌悬液至 96 孔板中, 随后加入 20 μL CCE, 使其蛋白终质量浓度分别为 10, 20, 40, 80 μg/mL 及 160 μg/mL, 且以等量 PBS 缓冲液为阴性对照, 30 ℃ 培养 24 h, 每隔 2 h 测定其 OD_{595nm} 值。

1.3.6 菌株 YF-2 对 AHLs 标品的降解作用 将 C₄-HSL、C₆-HSL 和 C₈-HSL 信号分子标品分别与菌株 YF-2 的 CCE (10, 20, 40, 80 μg/mL 及 160 μg/mL) 混合, 使 AHLs 标品终浓度为 10 mmol/L, 于 30 ℃ 共培养 24 h, 4 ℃, 10 000 r/min 离心 5 min 收集共培养物上清液, 采用琼脂平板扩散法检测剩余 AHLs 含量, 以 PBS 缓冲液为阴性对照。

1.3.7 菌株 YF-2 对荧光假单胞菌生物膜的影响

1) 生物膜抑制 在 96 孔板中, 将菌株 YF-2 CCE 添加到含有荧光假单胞菌 (600 nm 处 OD 值为 0.8) 的 LB 肉汤中, 使其蛋白终质量浓度分别

为 20, 40 μg/mL 和 80 μg/mL, 30 ℃ 培养 24 h 后, 取上层液体检测荧光假单胞菌存活情况, 用 PBS 缓冲液缓慢清洗孔 3~5 次, 加入结晶紫进行染色处理, 用 PBS 缓冲液缓慢冲洗 5~8 次, 烘干处理 10~15 min, 最后加入 200 μL 33% 冰醋酸, 595 nm 处的 OD 值即生物膜相对含量。

2) 生物膜清除 在 96 孔板中对荧光假单胞菌进行传代培养, 30 ℃ 培养 24 h 后吸出孔中悬浮液, 用 PBS 缓冲液冲洗孔 3~5 次。向孔内添加蛋白终质量浓度分别为 20, 40 μg/mL 和 80 μg/mL 的菌株 YF-2CCE, 于 30 ℃ 培养 24 h 后, 按 1.3.7 节方法分析生物膜含量。

3) 浮游细胞存活率 将 100 μL 荧光假单胞菌悬浮液离心, 取沉淀, 重悬于 0.85% 生理盐水, 选取合适梯度涂布计数。

4) 激光共聚焦显微镜分析 将大小一致的无菌玻璃片提前置入 24 孔板中, 按上述方法用菌株 YF-2 CCE 抑制或清除荧光假单胞菌生物膜。用 PBS 缓冲液冲洗载玻片 3~5 次后, 用 2.5% 的戊二醛溶液在 4 ℃ 下固定生物膜 30 min。固定后用 AO/EB 双染液染色 15 min, 然后用无菌 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 干燥 30 min, 加入 10 μL 抗荧光淬灭封片剂, 用激光共聚焦显微镜进行观察。观察条件: 发射波长 525 nm, 激发波长 488 nm, 放大倍数 10×。生物被膜的三维结构用 Leica TCS SP5 软件绘制。

1.3.8 菌株鉴定 形态学观察: 对菌株 YF-2 进行划线纯化, 待平板中有单菌落形成后观察菌株 YF-2 的形态, 同时进行革兰氏染色试验。生理生化反应: 参照文献^[20]对菌株 YF-2 进行生理、生化鉴定。16S rDNA 核酸序列分析: 取菌株 YF-2 3 代培养物 1.0 mL, 4 ℃, 10 000 r/min 离心 5 min, 参考孙梦桐等^[21]的方法进行 16S rDNA 测序。

2 结果与分析

2.1 菌株 YF-2 对荧光假单胞菌群体淬灭活性的验证

采用琼脂平板扩散法验证菌株 YF-2 对荧光假单胞菌 AHLs 粗提物的淬灭活性。如图 1a 所示, 菌株 YF-2 对荧光假单胞菌 AHLs 粗提物的降

解率达 100%, 淬灭活性良好, 可进行后续试验。

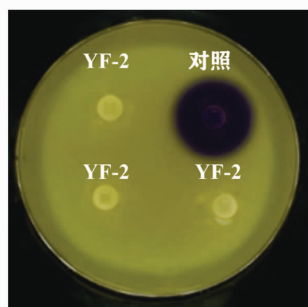
2.2 菌株 YF-2 淬灭活性物质的位置及类型确定

由图 1b 可知, 与对照相比, 菌株 YF-2 菌悬液对 C_4 -HSL 具有淬灭活性, 降解率未达 100%。CFS 对 C_4 -HSL 没有淬灭作用, CCE 对 C_4 -HSL 的降解率为 100%。结果表明, 菌株 YF-2 对 C_4 -HSL 具有淬灭活性且淬灭活性物质存在于 CCE 中。崔天琦等^[22]在探究清酒乳杆菌 YP4-1-1 的淬灭活性位置时发现, 相较于菌株 YP4-1-1 的 CFS, 菌株 YP4-1-1 的 CCE 对嗜水气单胞菌 AHLs 的淬灭效果较好, 本研究结果与其相似。选择菌株 YF-2 的 CCE 进行后续研究。

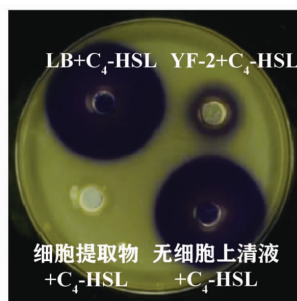
图 1c 为菌株 YF-2 的 CCE 经 100 °C 灭活 30 min 后对 C_4 -HSL 的淬灭活性。与未灭活的对照组相比, 菌株 YF-2 的 CCE 经热处理对 C_4 -HSL 的

淬灭活性消失。结果表明, 菌株 YF-2 CCE 中的淬灭活性物质热稳定性差, 高温易失活, 推测其可能是酶类物质。

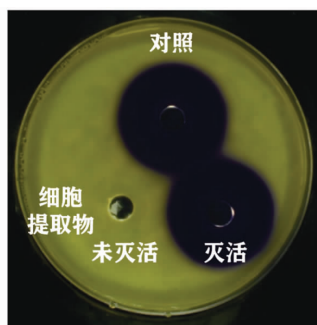
在群体感应淬灭酶中, 内酯酶通过水解 AHLs 的内酯环发挥作用, 然而, 酸性条件下内酯环的降解是可逆的, 酰基转移酶不可逆地水解酰基链和 AHL 环之间的酰胺键, 产生相应的游离脂肪酸和高丝氨酸内酯^[23-24]。氧化-还原酶通过氧化或还原第 3 碳位置上的酰基侧链来不可逆地改变 AHLs 的化学结构^[25]。如图 1d 所示, 将被菌株 YF-2 淬灭物质降解的 C_8 -HSL 置于酸性条件后, C_8 -HSL 活性部分恢复, 产生紫色显色圈, 然而, 与对照相比差异不显著。由此可知, 菌株 YF-2 CCE 中淬灭物质除含有内酯酶外, 可能还含有酰基转移酶或氧化还原酶。



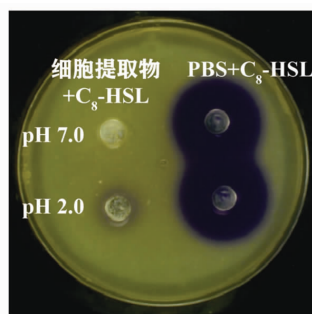
(a) 菌株 YF-2 对荧光假单胞菌群体淬灭活性的验证



(b) 菌株 YF-2 淬灭活性物质的位置确定



(c) 菌株 YF-2 淬灭活性物质的类型确定



(d) 菌株 YF-2 淬灭酶的类型确定

图 1 菌株 YF-2 对荧光假单胞菌群体淬灭活性验证及淬灭活性物质位置和类型的确定

Fig.1 Validation of QQ activity of strain YF-2 against *P. fluorescens* and determination of the location and types of QQ active substances

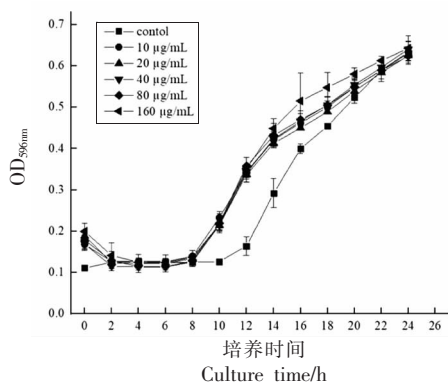
2.3 菌株 YF-2 CCE 对信号分子标品的降解

图 2a 为添加不同蛋白质量浓度 CCE 时紫色杆菌 CV026 的生长曲线。紫色杆菌 CV026 呈现 S 型特征生长曲线, 说明所选菌株 YF-2 CCE 蛋白质量浓度对紫色杆菌 CV026 的生长无影响。

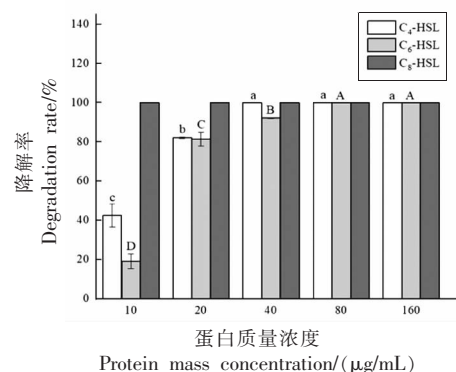
蛋白质量浓度分别为 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CCE 对 AHLs 标品 (C_4 -HSL、 C_6 -HSL 及 C_8 -HSL) 的降解效果如图 2b~2c 所示。菌株 YF-2 CCE 对 C_4 -HSL 和 C_6 -HSL 的降解效果呈浓度依赖性, 且当质量浓度达 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后, CCE 可

完全降解 C_4 -HSL 和 C_6 -HSL 信号分子。此外,在所选 CCE 蛋白质量浓度下对 C_8 -HSL 的降解率均为 100%。结果表明,菌株 YF-2 CCE 在不影响紫色杆菌 CV026 生长的情况下,对 AHLs 具有显著

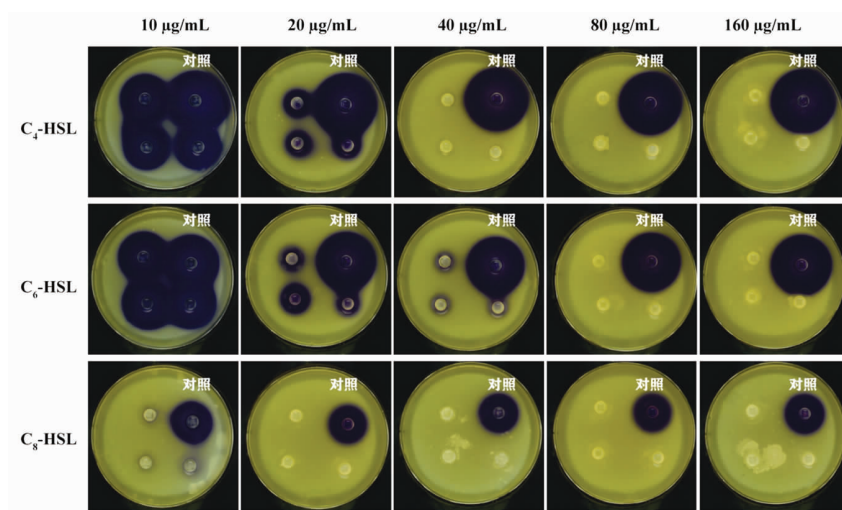
的淬灭效果。为了探究 CCE 对荧光假单胞菌群体感应系统的干扰作用,选择蛋白质量浓度 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CCE 对荧光假单胞菌生物膜进行抑制和清除作用研究。



(a) YF-2 CCE 对紫色杆菌 CV026 生长的影响



(b) YF-2 CCE 对 AHLs 标品的降解率



(c) YF-2 CCE 对 AHLs 标品的降解效果

注: A、B、C、D 及 a、b、c 表示不同蛋白质量浓度 YF-2 CCE 处理具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

图 2 菌株 YF-2 CCE 对紫色杆菌 CV026 生长的影响(a)及对 AHLs 标品的降解效果(b,c)

Fig.2 Effects of strain YF-2 CCE on the growth of *C. violaceum* CV026 (a) and degradation of AHLs standard (b, c)

2.4 菌株 YF-2 CCE 对荧光假单胞菌生物膜的影响

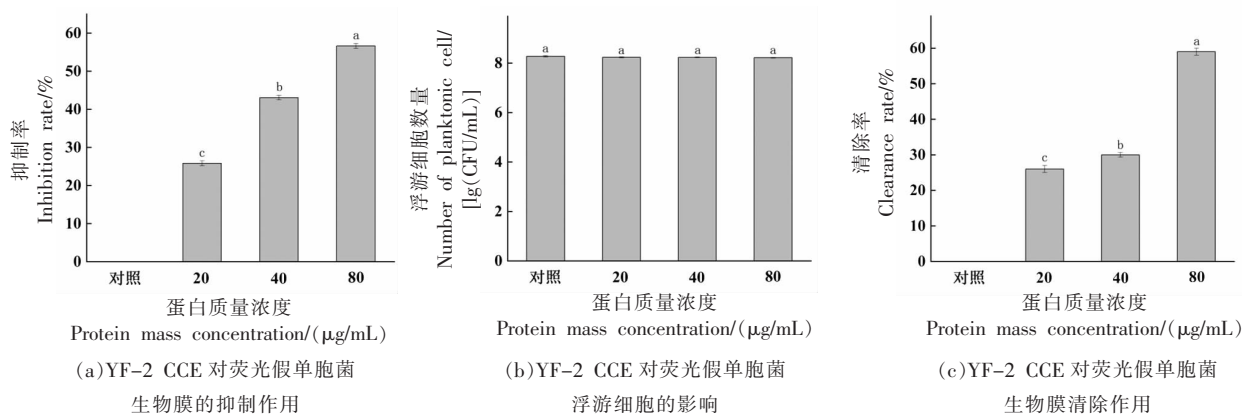
2.4.1 定量分析 生物膜的形成涉及寄主与非生物表面、生物膜中的病原体、细胞外聚合物基质和周围的生物液之间复杂的动态相互作用。生物膜形成后,附着强度和黏弹性使其难从表面去除,抵抗力的增强使得微生物对抗菌剂具有耐受性^[26]。研究表明,荧光假单胞菌生物膜的形成受其群体感应系统的调控^[27]。菌株 YF-2 CCE 对荧光假单

胞菌生物膜的抑制作用如图 3a 所示,蛋白质量浓度 20, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CCE 对生物膜生成的抑制率在 25.84%~56.63%。菌株 YF-2 CCE 对荧光假单胞菌生物膜的抑制效果具有质量浓度依赖性。对浮游细胞测定结果显示(图 3b),菌株 YF-2 CCE 在拮抗荧光假单胞菌生物膜形成时,不影响其浮游细胞的正常生长,表明菌株 YF-2 CCE 对荧光假单胞菌的生长没有抑制作用。Raafat 等^[28]发现经蜡样芽孢杆菌 30b 菌株无细胞裂解液

处理的铜绿假单胞菌 PAO1 的生物膜形成量减少 72%~86%,且不影响浮游细胞存活率,本研究结果与其相似。

图 3c 为菌株 YF-2 CCE 对已形成荧光假单

胞菌生物膜的清除效果,蛋白质质量浓度 20,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CCE 对荧光假单胞菌生物膜的清除率分别为 26.12%,30.54%和 59.35%,说明菌株 YF-2 具有一定的生物膜清除能力。



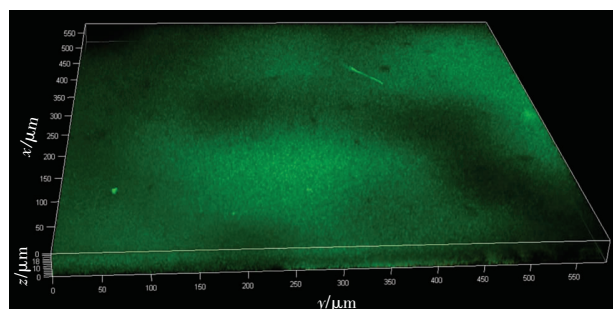
注:不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 3 定量分析菌株 YF-2 CCE 对荧光假单胞菌生物膜的抑制(a)、浮游细胞的影响(b)及对荧光假单胞菌生物膜清除(c)作用

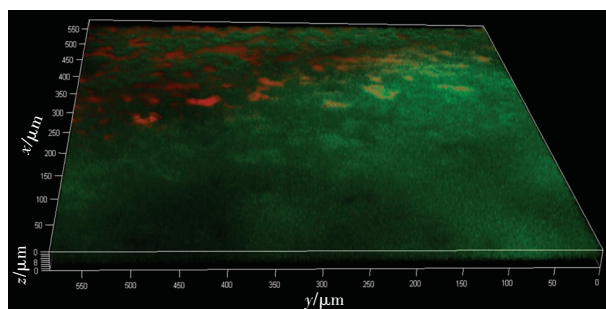
Fig.3 Quantitative analysis of strain YF-2 CCE on *P. fluorescens* biofilm inhibition (a) and the effect of planktonic cells (b) and the clearance of *P. fluorescens* biofilm (c)

2.4.2 激光共聚焦显微镜分析 当微生物附着在物体表面和彼此之间时,通常会形成多层生物膜,用激光共聚焦显微镜可以进一步观察生物膜三维结构^[29]。荧光假单胞菌活/死细胞用特异性荧光标记进行染色。活细胞发出绿色荧光,死亡和受损细胞发出红色荧光。菌株 YF-2 CCE 对荧光假单胞菌生物膜的抑制作用如图 4 所示。对照组生物膜结构致密完整,厚度为 26 μm ,几乎没有死菌。随着菌株 YF-2 CCE 浓度的提高,所形成的生物膜结构越来越不完整,厚度从 26 μm 减到 7 μm ,膜

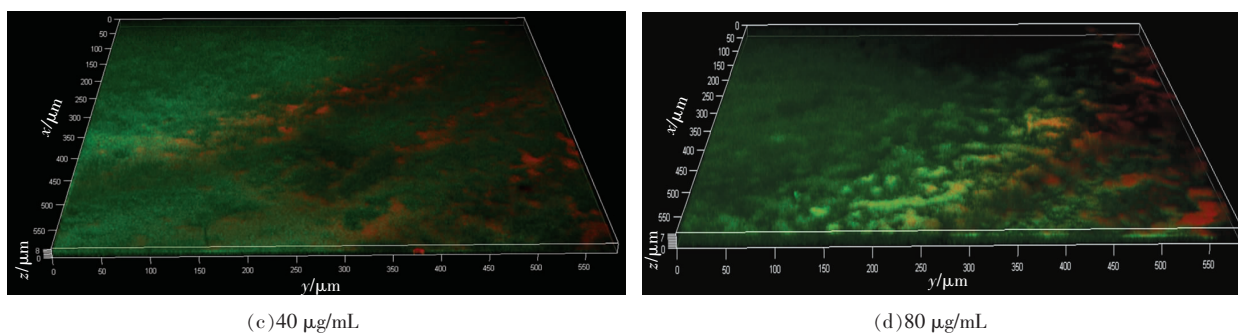
结构被破坏。这一结果与生物膜定量分析结果一致,表明 3 个蛋白质质量浓度下的菌株 YF-2 CCE 对荧光假单胞菌生物膜的形成有一定的抑制作用。Devi 等^[30]将枯草杆菌 R-18 提取物处理和未处理的粘质链霉菌生物膜在激光共聚焦显微镜观察,与对照相比,处理组的生物膜厚度减少。这表明枯草杆菌 R-18 提取物干扰了粘质链霉菌的群体感应系统,导致生物膜的破坏。与本研究结果相似。



(a) 对照



(b) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$



(c) 40 μg/mL

(d) 80 μg/mL

注: x 表示生物膜宽度; y 表示生物膜长度; z 表示生物膜厚度。

图 4 激光共聚焦显微镜分析菌株 YF-2 CCE 对荧光假单胞菌生物膜的抑制作用

Fig.4 Confocal laser scanning microscope analysis of inhibition on *P. fluorescens* biofilm by strain YF-2 CCE

2.5 菌株鉴定

图 5a 显示菌株 YF-2 在 LB 固体培养基上呈圆形或近似圆形, 个体较大, 黄色, 有光泽, 为不透明的凸起菌落, 其质地柔软。菌株经革兰氏染色后, 在光学显微镜下呈蓝紫色(图 5b), 杆状, 菌体单个或长链状排列, 属革兰氏阳性菌。表 1 为菌株 YF-2 的生理、生化鉴定结果。根据文献^[8]和形态学分析, 可预判菌株 YF-2 为蜡样芽孢杆菌。

图 5c 为菌株 YF-2 的 16S rDNA 基因扩增电泳图, 可知菌株 YF-2 的标片段被成功扩增, 且 PCR 产物在 1 500 bp 附近出现特征条带。将扩增产物送至上海生工测序分析, 通过 NCBI 数据库比对测序结果并构建系统发育树(图 5d)。菌株 YF-2 与 *Bacillus cereus* (MN691546.1) 亲缘关系最近, 显示 100% 同源性, 因此可鉴定菌株 YF-2 为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。

表 1 菌株 YF-2 的生理、生化鉴定结果

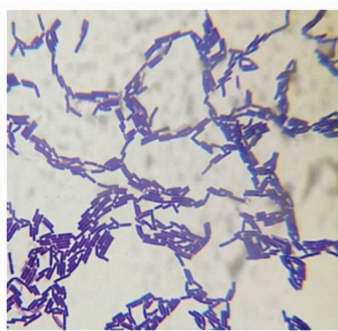
Table 1 Physiological and biochemical identification results of strain YF-2

项目	结果	项目	结果	项目	结果
阿拉伯糖	-	乳糖	-	甘露醇	-
纤维二糖	-	麦芽糖	+	山梨醇	-
七叶苷	+	棉籽糖	-	松三糖	-
葡萄糖酸盐	-	鼠李糖	-	蜜二糖	-
木糖	+	半乳糖	-	蔗糖	+
葡萄糖	+	甘露糖	-	果糖	+

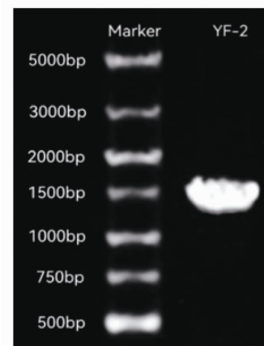
注: “+”表示阳性; “-”表示阴性。



(a) 菌株 YF-2 在平板中形态



(b) 菌株 YF-2 在光学显微镜下形态



(c) 菌株 YF-2 16S rDNA 基因扩增电泳图

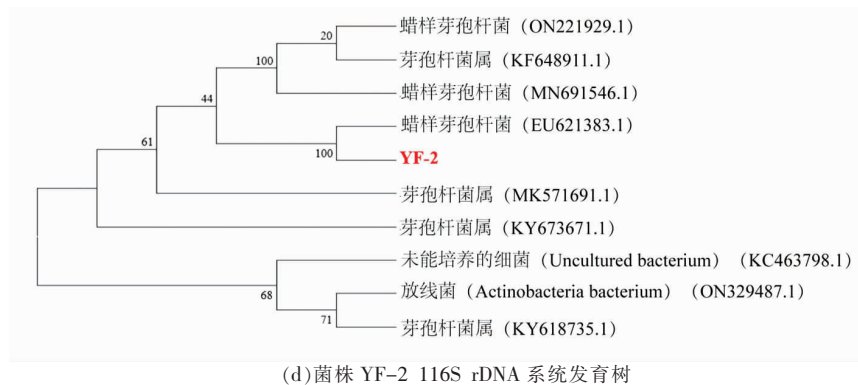


图5 菌株 YF-2 在平板(a)及光学显微镜(b)下的形态(革兰氏染色,1 000×)和 16S rDNA 基因扩增电泳图(c)及 16S rDNA 系统发育树(d)

Fig.5 Morphology of strain YF-2 under plate (a) and light microscope (b)(Gram Staining, 1 000×) and 16S rDNA gene amplification electropherogram (c) and 16S rDNA phylogenetic tree (d)

3 结论

本研究获得 1 株对荧光假单胞菌群体感应系统淬灭效果良好的蜡样芽孢杆菌 YF-2,通过热灭活和酸敏感试验初步确定淬灭酶存在于菌株 YF-2 的无细胞提取物中,为酰基转移酶或氧化-还原酶。蛋白质量浓度为 20,40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 80 mg/mL 的淬灭酶对 $\text{C}_4\text{-HSL}$ 、 $\text{C}_6\text{-HSL}$ 及 $\text{C}_8\text{-HSL}$ 具有良好的淬灭效果,对荧光假单胞菌生物膜的抑制率和清除率分别为 25.84%~56.63%和 26.12%~59.35%,且不影响浮游细胞的存活率。激光共聚焦显微镜分析发现,经蜡样芽孢杆菌 YF-2 淬灭酶处理后荧光假单胞菌生物膜厚度减少,且膜结构被破坏。综上,蜡样芽孢杆菌 YF-2 淬灭酶对荧光假单胞菌群体感应系统具有干扰作用且能抑制生物膜的形成。

参 考 文 献

[1] ZHAO A F, ZHU J L, YE X F, et al. Inhibition of biofilm development and spoilage potential of *Shewanella baltica* by quorum sensing signal in cell-free supernatant from *Pseudomonas fluorescens* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 230: 73-80.

[2] AZIMI S, KLEMENTIEV A D, WHITELEY M, et al. Bacterial quorum sensing during infection[J]. Annual Review of Microbiology, 2020, 74(1): 201-219.

[3] TANG R, ZHU J L, FENG L F, et al. Characteri-

zation of *LuxI/LuxR* and their regulation involved in biofilm formation and stress resistance in fish spoilers *Pseudomonas fluorescens* [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 297: 60-71.

- [4] WANG X Y, XIE J. Quorum sensing system-regulated proteins affect the spoilage potential of co-cultured *Acinetobacter johnsonii* and *Pseudomonas fluorescens* from spoiled bigeye tuna (*Thunnus obesus*) as determined by proteomic analysis[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 940.
- [5] MURIEL C, BLANCO-ROMERO E, TRAMPARI E, et al. The diguanylate cyclase AdrA regulates flagellar biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* F113 through SadB [J]. Scientific Reports, 2019, 9 (1): 80-96.
- [6] ZHAO X H, YE Z X, DING T, et al. Quorum-sensing regulation of antimicrobial resistance in bacteria [J]. International Journal of Microorganisms, 2019, 8(3): 425.
- [7] WU S B, LIU J H, LIU C J, et al. Quorum sensing for population-level control of bacteria and potential therapeutic applications [J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2020, 77(7): 1319-1343.
- [8] STEPHENS K, BENTLEY W E. Synthetic biology for manipulating quorum sensing in microbial consortia [J]. Trends in Microbiology, 2020, 28 (8): 633-643.
- [9] DEFOIRD T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy [J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(4): 313-328.

- [10] KALIA V C, PATEL S K S, KANG Y C, et al. Quorum sensing inhibitors as antipathogens: Biotechnological applications [J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 37(1): 68–90.
- [11] GUENDOUZE A, PLENER L, BZDRENGA J, et al. Effect of quorum quenching lactonase in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with quorum sensing inhibitors[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 227.
- [12] DONG Y H, WANG L H, XU J L, et al. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an *N*-acyl homoserine lactonase[J]. *Nature*, 2001, 411(6939): 813–817.
- [13] NITHYA C, ARAVINDRAJA C, PANDIAN S K. *Bacillus pumilus* of Palk Bay origin inhibits quorum-sensing-mediated virulence factors in Gram-negative bacteria[J]. *Research in Microbiology*, 2010, 161(4): 293–304.
- [14] FETZNER S. Quorum quenching enzymes[J]. *Journal of Biotechnology*, 2015, 201: 2–14.
- [15] 丁婷. 基于荧光假单胞菌群体感应的抑制剂筛选及抑制机理探究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- DING T. Screening and inhibition mechanism of *Pseudomonas fluorescens* based on quorum-sensing [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2019.
- [16] 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- Food Science and Technology*, 2020, 117: 108696.
- [17] TORRES M, RUBIO-PORTILLO E, ANTON J, et al. Selection of the *N*-acylhomoserine lactone-degrading bacterium *Alteromonas stellipolaris* PQQ-42 and of its potential for biocontrol in aquaculture [J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 646.
- [18] ROMERO M, MURAS A, MAYER C, et al. *In vitro* quenching of fish pathogen *Edwardsiella tarda* AHL production using marine bacterium *Tenacibaculum* sp. strain 20J cell extracts [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, 108(3): 217–225.
- [19] 李欣蔚. 东北地区自然发酵酸菜中乳酸菌时空分布规律的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
- LI X W. Study on spatial and temporal distribution of lactic acid bacteria in naturally fermented Sauerkraut in Northeast China[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2017.
- [20] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 289–294.
- DONG X Z, CAI M Y. Handbook of systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 289–294.
- [21] 孙梦桐, 吕欣然, 崔天琦, 等. 鱼类肠道中抑制哈维氏弧菌群体感应及生物膜形成的乳酸菌的筛选和鉴定[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(8): 255–263.
- SUN M T, LÜ X R, CUI T Q, et al. Screening and identification of lactic acid bacteria that inhibit *Vibrio harveilli* quorum sensing and biofilm formation in fish gut[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(8): 255–263.
- [22] 崔天琦, 吕欣然, 孙梦桐, 等. 降解嗜水气单胞菌群体感应 AHLs 信号分子的乳酸菌筛选及淬灭作用[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 19–29.
- CUI T Q, LÜ X R, SUN M T, et al. Degradation of *Aeromonas hydrophila* quorum sensing AHLs signal molecules by lactic acid bacteria screening and quenching[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(9): 19–29.
- [23] NIAN Z, ADHIKARI U K, ABDULLA F, et al. Computational prediction of active sites and ligands in different AHL quorum quenching lactonases and acylases[J]. *Journal of Biosciences*, 2020, 45(1): 1–19.
- [24] PHILEM P D, YADAV Y, VELLORE SUNDER A, et al. Structural and enzymatic analysis of a dimeric cholyglycine hydrolase like acylase active on *N*-acyl homoserine lactones[J]. *Biochimie*, 2020, 177: 108–116.
- [25] RODRIGO V B, DANIEL H, JESUS F L, et al. Penicillin acylase from *Streptomyces lavendulae* and aculeacin a acylase from *Actinoplanes utahensis*: Two versatile enzymes as useful tools for quorum quenching processes[J]. *Catalysts*, 2020, 10(7): 730.
- [26] KOO H, ALLAN R N, JHOWLIN R P, et al. Targeting microbial biofilms: Current and prospective therapeutic strategies[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(12): 740–755.
- [27] EMILIE T R, ESTELLE J B, BRIGITTE L, et al. The social life of *Aeromonas* through biofilm and quorum sensing systems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 37.
- [28] RAAFAT M M, ALI E D, TAMMAM M. Quorum quenching activity of *Bacillus cereus* isolate 30b

- confers antipathogenic effects in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Infect Drug Resist*, 2019, 12: 1583–1596.
- [29] GEBREYOHANNES G, NYERERE A, BII C, et al. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms [J]. *Heliyon*, 2019, 5(8): e02192.
- [30] DEVI K R, SRINIVASAN S, RAVI A V. Inhibition of quorum sensing-mediated virulence in *Serratia marcescens* by *Bacillus subtilis* R-18 [J]. *Microb Pathog*, 2018, 120: 166–175.

The Quorum Sensing's Quenching Activity of *Bacillus cereus* YF-2 to *Pseudomonas fluorescens*

Wang Yangrui¹, Wen Xin¹, Bai Fengling¹, Tan Xiqian¹, Lü Xinran^{1*}, Li Jianrong^{1,2}, Dong Hao³,
Meng Yuqiong⁴, Ma Rui⁴, Wang Shulin⁴, Ying Miyan⁵, Yang Xu⁵

¹National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, School of Food Science and Engineering, Bohai University, Jinzhou 121013, Liaoning

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

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

⁴Qinghai University, Xining 810016

⁵Minze LongyangXia Aquaculture Co., Ltd., Hainan Tibetan Autonomous Prefecture 811800, Qinghai)

Abstract *Pseudomonas fluorescens* is a dominant spoilage bacterium commonly found in fresh aquatic products, and its spoilage ability is regulated by a quorum-sensing system of *N*-homoserine lactones (AHLs). Based on the quorum-sensing quenching activity, the type of quenching activity substance from strain YF-2 was analyzed using heat inactivation and acid sensitivity tests. The results showed that strain YF-2 had a significant quenching effect on *P. fluorescens* AHLs, with a degradation rate of 100%. Its quenching active substance existed in the crude cell extract (CCE), which was preliminarily identified as acyltransferase or oxidoreductase by heat inactivation and acid sensitivity assays. The degradation of C₄-HSL, C₆-HSL and C₈-HSL treated by the CCE at protein concentrations of 20, 40 μg/mL and 80 μg/mL ranged from 52.8% to 100%, and the inhibition and clearance rate of *P. fluorescens* biofilms ranged from 25.84% to 56.63% and 26.12% to 59.35%, respectively. In addition, the confocal laser scanning microscopy showed that the CCE reduced the thickness of *P. fluorescens* biofilm and disrupted the biofilm structure. Meanwhile, *Bacillus cereus* was recognized as the source of strain YF-2. The application of *B. cereus* to control the spoilage bacterium *P. fluorescens* in aquatic goods will have a theoretical foundation thanks to this study.

Keywords quorum sensing; *Bacillus cereus*; *Pseudomonas fluorescens*; quorum-quenching enzyme