

## 高产 AI-2 副溶血性弧菌的筛选及毒力特性研究

袁 硕<sup>1</sup>, 王彦博<sup>1</sup>, 刘水琳<sup>2</sup>, 崔方超<sup>1</sup>, 檀茜倩<sup>1</sup>, 吕欣然<sup>1\*</sup>, 励建荣<sup>1,3</sup>, 李学鹏<sup>1</sup>, 董 浩<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>大连海关技术中心 辽宁大连 116034

<sup>3</sup>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

<sup>4</sup>山东美佳集团有限公司 山东日照 276800)

**摘要** 副溶血性弧菌是一种常见的食源性致病菌,其运动能力、生物被膜形成和毒力因子产生等受 AI-2/LuxS 型群体感应系统调控。本研究从 9 株副溶血性弧菌中筛选具有高产 AI-2 信号分子能力的菌株,通过添加外源 AI-2 信号分子分析其对生物被膜、毒力因子和运动性等的影响。结果表明,获得 1 株高产 AI-2 信号分子的副溶血性弧菌 VP-4,添加不同体积分数的外源 AI-2 信号分子(1%~7%)对其生物被膜、明胶酶、卵磷脂酶、淀粉酶、运动能力和溶血性的促进率分别为 33.02%~67.87%,1.67%~7.26%,3.25%~48.15%,1.21%~12.17%,4.92%~35.98%,4.15%~50.60%,2.06%~15.23%。同时,扫描电镜观察发现添加外源 AI-2 信号分子的副溶血性弧菌生物被膜菌体聚集堆积,厚度增加,结构致密。上述结果说明 AI-2 信号分子可以促进副溶血性弧菌生物被膜的形成及毒力因子的释放,提高其运动能力。本研究可为控制海产品中副溶血性弧菌的致病性提供新靶点。

**关键词** 海产品; 副溶血性弧菌; AI-2/LuxS; 生物被膜; 毒力因子

**文章编号** 1009-7848(2025)02-0115-09 **DOI**: 10.16429/j.1009-7848.2025.02.010

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种常见的食源性致病菌,也是海产品引起人类肠道疾病的重要原因之一。它一方面通过污染鱼、虾、贝等产品,给水产养殖业造成巨大的经济损失;另一方面通过其极强的黏附性附着在海产品(牡蛎、贻贝和虾)及加工设备的表面形成成熟的生物被膜,产生胞外酶、溶血素等毒力因子,造成巨大的食品安全隐患,也严重威胁人类健康<sup>[1-2]</sup>。

研究表明,副溶血性弧菌生物被膜的形成及毒力因子产生受群体感应(Quorum sensing, QS)调节<sup>[3]</sup>。群体感应是一种细胞信号机制,通过分泌自诱导因子来响应细胞群体密度的波动。当其累积到一定密度时与信号分子受体结合,然后调控生物被膜形成、生物发光、毒力因子表达等特定性状表达<sup>[4]</sup>。副溶血性弧菌可以产生并响应 3 类自诱导因子,分别为哈氏自诱导物 *N*-酰基高丝氨酸内

酯(AHLs)、2 型自诱导物呋喃酮酰硼酸二酯(AI-2)和霍乱自诱导物 *S*-3-羟基十三烷-4-酮(CAI-1)<sup>[5]</sup>。3 种群体感应信号调控通路在不同的细胞密度条件下都可发挥作用,其调控作用多样且复杂。AI-2/LuxS 群体感应系统是由信号分子 AI-2 (呋喃酮酰硼酸二酯)传导的,用于细菌种间信息交流的系统<sup>[6-7]</sup>,而其对海产品中副溶血性弧菌生物被膜和毒力因子的调控作用还不清楚。

本文从海产品源的 9 株副溶血性弧菌中筛选高产 AI-2 信号分子的副溶血性弧菌,采用生物发光法、结晶紫染色法、光学显微镜和扫描电镜等分析添加外源 AI-2 信号分子对菌株形成生物被膜、毒力因子和胞外多糖等的影响。以期探究 AI-2/LuxS 群体感应与副溶血性弧菌生物被膜形成和毒力因子产生间的关系,为控制海产品中副溶血性弧菌致病性提供新靶点。

收稿日期: 2024-02-07

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0901702);辽宁省教育厅面上项目(JYTMS20231621)

第一作者: 袁硕,女,硕士生

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

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂和仪器

1.1.1 菌株 9 株副溶血性弧菌:PJ、XF、VP-599 分离自海产品扇贝,VP-1、VP-2、VP-4 分离自海

产品牡蛎,VP-5、VP-6、VP-7 分离自海产品虾。哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)BB170 购自北纳创联生物技术有限公司。荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)分离自腐败大菱鲆。以上菌株均保藏于本院微生物实验室。

**1.1.2 培养基和试剂** AI-2 信号分子 (2 mmol/L), 上海赛可锐生物科技有限公司;2216E 培养基、我妻氏培养基、新鲜兔血,上海康朗生物科技有限公司;AB 培养基,上海保藏生物技术中心;2.5%戊二醛、0.5%草酸铵结晶紫染液、20×PBS 缓冲液,西安齐岳生物科技有限公司;磷酸二氢钾、三丁酸甘油酯,江苏采薇生物科技有限公司;乳化液 (4%聚乙烯醇溶液与三丁酸甘油酯以体积比 3:1 混合);明胶酶培养基(2216E 固体培养基加入 1.5%明胶);脂肪酶培养基(1%乳化液、0.5%牛肉膏、0.5%蛋白胨、0.25%酵母提取物、1.5%琼脂);卵磷脂酶培养基 (2216E 固体培养基灭菌冷却至 55 ℃左右时加入 10%鸡蛋黄);淀粉酶培养基 (2216E 固体培养基加入 1%可溶性淀粉);脲酶培养基 (0.1%蛋白胨、0.5%氯化钠、0.1%葡萄糖、0.2%磷酸二氢钾、0.0012%酚红、1.5%琼脂);血平板(我妻氏培养基灭菌冷却至 50 ℃加入 5%新鲜兔血)。

**1.1.3 仪器与设备** Imark 酶标仪,上海木森生物科技有限公司;SPX-250 生化培养箱,青岛精诚仪器仪表有限公司;Czone5F 全自动菌落计数器,杭州迅数科技有限公司;S-4800 扫描电镜,上海维翰光电科技有限公司;UV2550 紫外-可见分光光度计,青岛瑞明仪器设备有限公司;KS50R 台式高速冷冻离心机,盐城市凯特实验仪器有限公司;SW-CJ-1D 型超净工作台,苏州博莱尔净化设备。

## 1.2 方法

**1.2.1 高产 AI-2 信号分子副溶血性弧菌的筛选** 参照吕欣然等<sup>[8]</sup>的方法,采用生物发光法测定 9 株副溶血性弧菌产 AI-2 信号分子能力。取活化的哈维氏弧菌 BB170 以体积分数 1%接种于 AB 培养基,30 ℃振荡培养 12 h,于 8 000 r/min 离心 10 min,用 0.22 μm 的滤菌器过滤,收集上清液。以相同方法得到 30 ℃振荡培养 24 h 的副溶血性弧菌无细胞上清液。按体积比 1:100 分别将副溶血性弧菌上清液、哈维氏弧菌 BB170 上清液、AB 肉汤

和 2216E 肉汤分别添加到稀释后的哈维氏弧菌 BB170(1:1 000 稀释)培养液中,30 ℃培养 6 h。每隔 1 h 检测其生物发光强度。以哈维氏弧菌上清液作为阳性对照,AB 培养基和 2216E 培养基作为阴性和介质对照。

**1.2.2 培养时间对副溶血性弧菌形成生物被膜的影响** 在 96 孔板中加入 200 μL/孔 LB 培养基,按积分分数 1%接种副溶血性弧菌菌悬液 (1×10<sup>8</sup> CFU/mL),置于摇床中 30 ℃分别培养 12,18,24,36,48 h。参照 Wang 等<sup>[9]</sup>的方法采用结晶紫染色法测定生物膜形成能力。

**1.2.3 添加外源 AI-2 信号分子对副溶血性弧菌生物被膜的影响**

**1.2.3.1 定量分析** 参照杨杰<sup>[10]</sup>的方法,在 96 孔板中加入 200 μL 含一系列体积分数 (0,1%,3%,5%和 7%)的外源 AI-2 的 LB 培养基,按体积分数 1%接种副溶血性弧菌菌悬液 (1×10<sup>8</sup> CFU/mL),30 ℃振荡培养 24 h。培养完成后采用 1.2.2 节所述的结晶紫染色法检测生物被膜。

**1.2.3.2 光学显微镜观察** 向放置有无菌玻璃片 (1 cm×1 cm×1 mm)的 24 孔板中加入 1 mL LB 液体培养基,按体积分数 1%接种副溶血性弧菌菌悬液 (1×10<sup>8</sup> CFU/mL),30 ℃振荡培养 24 h。将玻璃片用无菌水充分漂洗,去除浮游菌,每孔加入 500 μL 0.5%结晶紫染色 30 min 后,无菌水漂洗干净,28 ℃干燥 20 min 后于光学显微镜下观察。

**1.2.3.3 扫描电镜观察** 在放置有硅片 (10 mm×10 mm×0.5 mm)的 24 孔板中加入 1 mL 含不同体积分数 (0,1%,3%,5%和 7%)外源 AI-2 的 LB 肉汤,按体积分数 1%接种副溶血性弧菌菌悬液 (1×10<sup>8</sup> CFU/mL),30 ℃振荡培养 24 h。然后移除孔中悬浮液,用无菌水清洗 2~3 次,加入 500 μL 2.5%戊二醛溶液于 4 ℃固定 12 h 后,用 40%,70%,90%,100%乙醇梯度洗脱 15 min,干燥、喷金,扫描电镜 (Scanning electron microscope, SEM)观察。

**1.2.4 添加外源 AI-2 信号分子对副溶血性弧菌运动性的影响** 将活化后的副溶血性弧菌 (1×10<sup>8</sup> CFU/mL)以 1%接种于添加了一系列体积分数 (0,1%,3%,5%和 7%)外源 AI-2 的 LB 培养基中,30 ℃振荡培养 24 h。参照 Zhao 等<sup>[11]</sup>的培养方法,取 2 μL 上述培养后样品接种于群集平板 (1.5%琼脂的

BHI 培养基) 和泳动平板 (1%胰蛋白陈、3%NaCl 和 0.3%琼脂) 中央, 30 °C 振荡培养 24 h, 使用菌落计数仪测量培养基上菌落迁移直径, 促进率计算方法如式(1)所示。

$$\text{促进率}(\%) = (d_i - d_j) / d_j \times 100 \quad (1)$$

式中:  $d_j$  为空白对照组菌落运动迁移直径, mm;  $d_i$  为添加外源 AI-2 信号分子处理组菌落运动迁移直径, mm。

**1.2.5 添加外源 AI-2 信号分子对副溶血性弧菌胞外酶和溶血活性的影响** 参照 Hasan 等<sup>[12]</sup>的方法测定添加外源 AI-2 信号分子对明胶酶和淀粉酶的影响。将活化后的副溶血性弧菌 ( $1 \times 10^8$  CFU/mL) 以 1% 接种量接种于含一系列体积分数 (0, 1%, 3%, 5% 和 7%) 外源 AI-2 的 LB 培养基中, 30 °C 振荡培养 24 h。在摆有牛津杯的素琼脂平板中倒入血平板, 加入 180  $\mu$ L/孔培养物<sup>[13]</sup>, 30 °C 培养 48 h。在明胶酶、卵磷脂酶、淀粉酶和脲酶平板上分别点 5  $\mu$ L 培养物, 于 30 °C 培养 24 h。

观察时在明胶酶平板上的菌落周围滴加 0.5 mg/mL 三氯乙酸溶液, 在淀粉酶平板上滴加碘液, 观察菌落周围是否有透明圈。卵磷脂酶平板直接观察菌落周围是否有乳白色浑浊圈。脲酶平板上观察菌落周围粉红色圈。血平板上观察菌落周围深红色溶血圈。测量透明圈、乳白色浑浊圈、粉红色圈和溶血圈直径大小, 其促进率按式(1)计算。

**1.2.6 数据处理与统计分析** 试验结果均平行测定 3 次, 结果用平均值  $\pm$  标准差表示, 并采用 IBM SPSS 23 软件以及 Origin Pro 9.1 软件对数据进

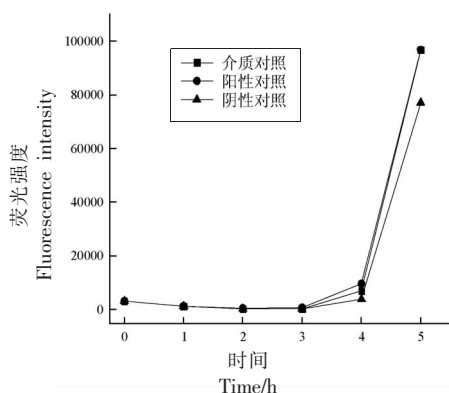
行分析处理。

## 2 结果与讨论

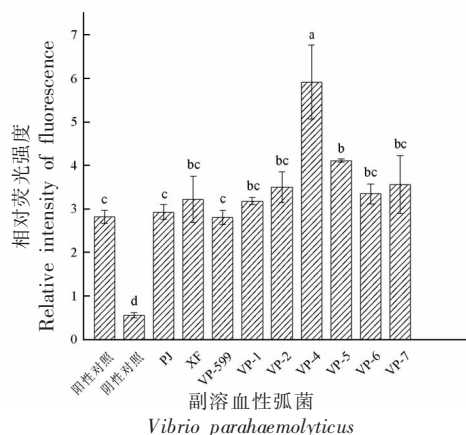
### 2.1 产 AI-2 信号分子副溶血性弧菌的筛选

AI-2/LuxS 是细菌中普遍存在的、用于种间交流的一类群体感应系统, 可调控细菌的多种生物学功能, 如生物发光、生物被膜形成、运动能力和致病基因的表达等<sup>[14]</sup>。哈维氏弧菌 BB170 对 AI-2 信号分子非常敏感, 能够检测到极少的 AI-2 信号分子, 使其生物发光, 因此常作为检测 AI-2 信号分子的报告菌株<sup>[15]</sup>。

图 1a 为各对照组 AI-2 的荧光强度, 总体均是呈先下降后上升的趋势。培养初期, 作为阳性对照的哈维氏弧菌稀释后菌体密度较低, 菌液中存在较少的 AI-2 信号分子产生的荧光逐渐淬灭, 导致荧光强度逐渐减弱, 在 3 h 时达到 AI-2 活性最低点。当哈维氏弧菌菌体密度增加至一定值时, 其产生的 AI-2 信号分子重新诱导发光, 随后荧光强度逐渐升高。因此, 可选择 3 h 测定各菌株产 AI-2 的相对荧光强度最为准确。图 1b 为 9 株副溶血性弧菌的相对荧光强度。如图所示, 9 株副溶血性弧菌的相对荧光强度均高于阴性对照, 表明 9 株菌都具有产生 AI-2 信号分子的能力, 其中菌株 VP-4 的相对荧光强度最大, 说明其产 AI-2 信号分子的能力最好。因此, 后续选择菌株 VP-4 探究外源 AI-2 信号分子对副溶血性弧菌生物被膜和毒力因子的影响。



(a) 对照组荧光强度



(b) 副溶血性弧菌 VP 菌株荧光强度

注: 不同小写字母表示各组间具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 下同。

图 1 高产 AI-2 信号分子副溶血性弧菌的筛选

Fig.1 Screening of *Vibrio parahaemolyticus* with high AI-2 production signal molecule



## 2.2 培养时间和外源 AI-2 对菌株 VP-4 生物被膜形成的影响

生物被膜是细菌细胞和细菌基质组成的结构性细菌群落。生物被膜的形成过程分为细菌可逆性黏附的定植、不可逆性黏附的聚集、生物被膜的成熟、细菌的脱落 4 个阶段<sup>[16]</sup>。如图 2a 所示,菌株 VP-4 的生物被膜形成量总体呈先增大后减少的趋势。在 12~18 h 内,菌株 VP-4 进入可逆性黏附的定植阶段和不可逆性黏附的聚集阶段,适应环境并迅速生长,黏附于介质表面形成生物被膜,该时间段 VP-4 的成膜量不断增加。在 24 h 左右,菌株 VP-4 进入生物被膜的成熟阶段,此时成膜量达到最大,OD<sub>600nm</sub> 在 2.53~2.85 之间。在 36~48 h 时,菌株 VP-4 成膜量大幅下降,进入细菌的脱落与再定植阶段,生物被膜发育进入扩散分解期,细胞从生物被膜中游离到介质中。因此,可推断菌株

VP-4 生物被膜形成的最佳培养时间为 24 h。

图 2b 是添加不同体积分数的外源 AI-2 信号分子对菌株 VP-4 生物被膜的影响。添加外源 AI-2 信号分子体积分数为 1%~7% 时,对菌株 VP-4 生物被膜的促进率为 33.02%~67.87%。由图可知,随着外源 AI-2 信号分子添加体积分数的增大,菌株 VP-4 生物被膜的成膜量逐渐增大,外源 AI-2 信号分子表现出显著的促进生物被膜形成作用,在外源 AI-2 信号分子体积分数为 7% 时,生物被膜促进率为 67.87%。Sun 等<sup>[17]</sup>采用结晶紫染色法测定杀鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella piscicida*)生物被膜形成量,研究突变株  $\Delta luxS$  与野生株生物被膜形成能力的差异,发现野生株生物被膜成膜量明显高于突变株,表明 LuxS/ AI-2 群体感应系统可以促进生物被膜的形成。本研究结果与其相似,说明 AI-2 可促进副溶血性弧菌生物被膜的形成。

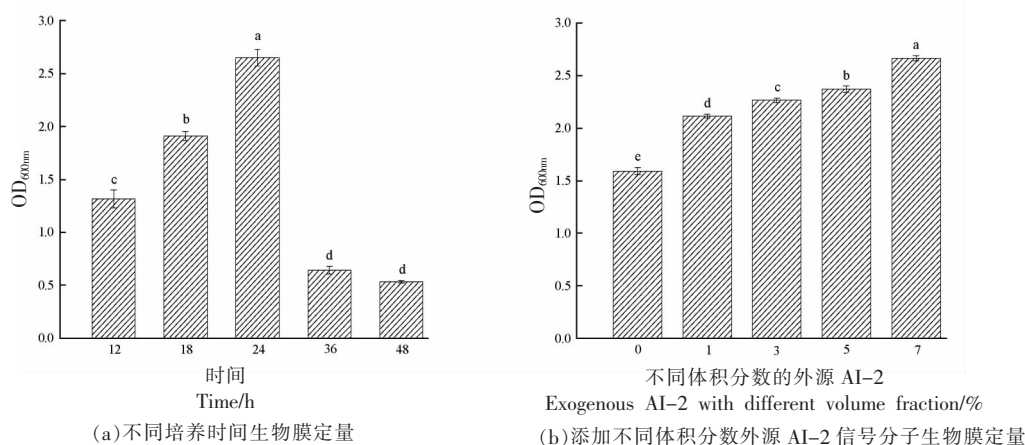


图 2 培养时间(a)和添加外源 AI-2 信号分子(b)对菌株 VP-4 生物被膜形成的影响

Fig.2 Effects of cultivation time (a) and addition of exogenous AI-2 signaling molecules (b) on biofilm formation of strain VP-4

## 2.3 添加外源 AI-2 信号分子的体积分数对 VP-4 生物被膜形态结构的影响

*luxS* 基因通过参与 AI-2 合成调节菌株生物被膜形成,并与生物被膜的形成呈正相关关系<sup>[18]</sup>。图 3 为光学显微镜和扫描电镜下添加不同体积分数外源 AI-2 信号分子对菌株 VP-4 生物被膜形态的影响。如图 3a 所示,在光学显微镜下,随着外源 AI-2 信号分子添加体积分数的增大,菌株 VP-4 菌体密度增大,分布逐渐紧密,出现明显的堆积聚集现象,生物被膜空隙逐渐减小,说明 AI-2 信

号分子具有良好的促进生物被膜形成作用。

如图 3b 所示,在扫描电镜放大 6 000 倍下,菌株 VP-4 培养 24 h 后,观察到明显的生物被膜结构。随着外源 AI-2 信号分子添加体积分数的增大,菌株 VP-4 出现明显的菌体堆积聚集现象,菌体密度不断增大,生物被膜空隙逐渐减小,最后形成致密的生物被膜结构,且与光学显微镜的观察结果一致。在外源 AI-2 信号分子体积分数为 1% 时,菌体分布较为松散平整,可观察到部分丝状物将菌体相互连接,形成稀疏的生物被膜结构。在外

源 AI-2 信号分子体积分数为 3%~5% 时, 菌体分布密集, 空隙较小, 出现堆积聚集现象, 逐渐形成大面积的单层排列状生物被膜结构。在外源 AI-2 信号分子体积分数为 7% 时, 菌体分布紧密, 大量堆积聚集形成厚度较大的致密生物被膜结构。结果表明, 添加外源 AI-2 信号分子可以促进菌株 VP-4 生物被膜的形成能力。Zhang 等<sup>[19]</sup>研究发现

信号分子 AI-2 对细菌的影响与多种生理代谢行为有关, 如细菌生长、形态特征、生物被膜发育和相关基因表达等, 添加外源 AI-2 可提高三弗朗西斯乳杆菌 (*Lactobacillus sanfranciscensis*) 的细胞密度, 促进菌株生物被膜的形成、生长和细菌内聚。本研究的结果与其具有一致性。

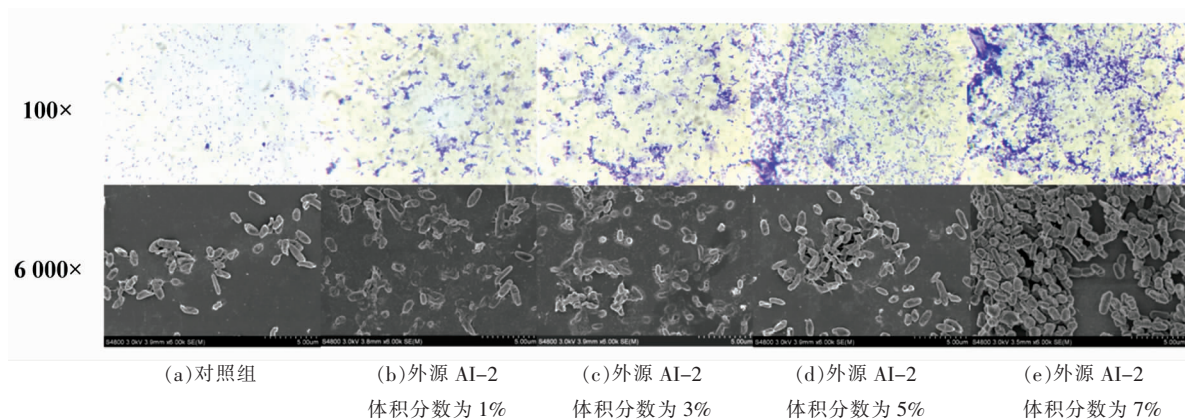


图 3 光学显微镜和扫描电镜下添加不同体积分数外源 AI-2 信号分子对菌株 VP-4 生物被膜形态的影响

Fig.3 Effects of different volume fractions of exogenous AI-2 signal molecules on the morphology of strain VP-4 biofilm under optical microscope and scanning electron microscope

#### 2.4 外源 AI-2 信号分子对菌株 VP-4 运动能力的影响

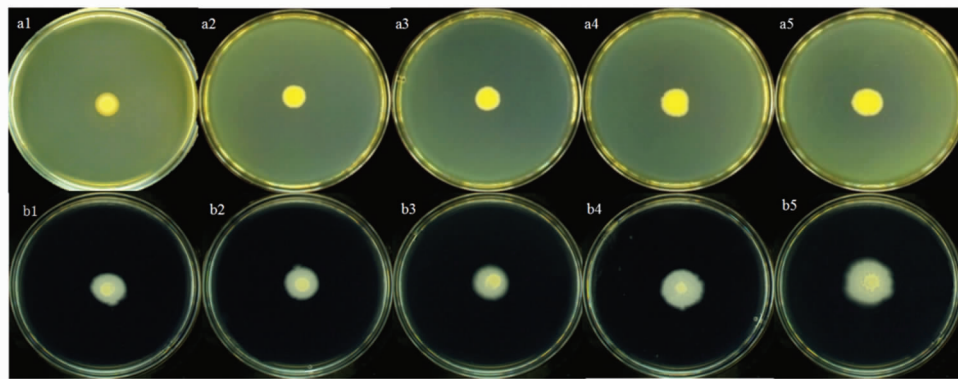
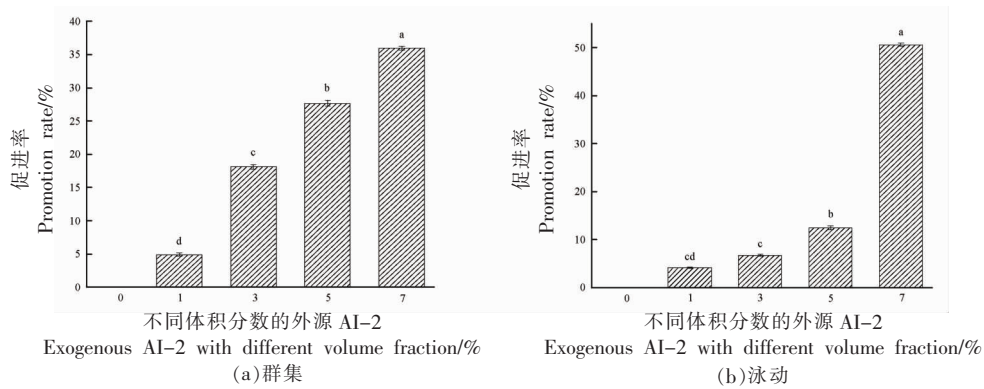
副溶血性弧菌的群集运动是一种群体性行为, 是多细胞依赖鞭毛在培养基表面由接种点向外的迁移运动。泳动运动是个体行为, 细菌在培养基表面作扩散运动<sup>[20-21]</sup>。鞭毛介导细菌的群集和泳动运动, 是重要的毒力决定因子, 与细菌的运动性、生物被膜形成能力和致病性密切相关<sup>[22-23]</sup>。运动性是细菌致病和生物被膜形成的重要因素之一<sup>[24]</sup>。AI-2 参与调节了多个功能基因的表达, 如细胞运动性、鞭毛形成和生物被膜形成等<sup>[25-26]</sup>。探究 AI-2 信号分子与运动性的关系, 有助于分析副溶血弧菌生物被膜的形成机制。

图 4 是添加不同体积分数的外源 AI-2 信号分子对菌株 VP-4 运动能力的影响。如图所示, 随着外源 AI-2 信号分子添加体积分数的增大, 菌株 VP-4 的群集和泳动迁移直径均逐渐增大, 对运动能力的促进率均呈上升趋势。经测量, 对照组群集和泳动直径分别为 11.20 mm 和 15.93 mm, 添加外源 AI-2 信号分子体积分数为 7% 时, 菌株 VP-4

群集泳动直径分别为 15.23 mm 和 23.98 mm, 促进率分别为 35.98% 和 50.57%。结果表明, 添加外源 AI-2 信号分子对副溶血性弧菌 VP-4 的运动性有显著的促进作用。Xiong 等<sup>[27]</sup>采用构建  $\Delta LuxS$  突变株分析 AI-2 信号分子对贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) SQR9 运动的影响, 研究发现突变株泳动迁移直径明显小于野生菌株, 在培养基中添加 AI-2 信号分子可使  $\Delta LuxS$  突变株泳动迁移恢复到正常水平。Bansal 等<sup>[28]</sup>通过探究不同浓度 AI-2 信号分子对肠出血性大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 泳动能力, 也发现外源 AI-2 信号分子可以提高菌株的运动性。这表明 AI-2 信号分子可提高菌株的运动能力。

#### 2.5 外源 AI-2 信号分子对菌株 VP-4 胞外酶和溶血性的影响

弧菌致病的源头是其产生的毒力因子, 包括胞外酶、生物发光和溶血素等<sup>[29]</sup>, 这些毒力因子与 AI-2/LuxS 群体感应系统密切相关。其中, 胞外酶能够将食品中的蛋白和糖类分解以获得生长所需营养物质, 在微生物的生长过程中起重要作用。溶



(c) 群集和泳动形态图  
注: c 图 1~5 分别表示外源 AI-2 体积分数为 0, 1%, 3%, 5%, 7%, a 表示群集, b 表示泳动。

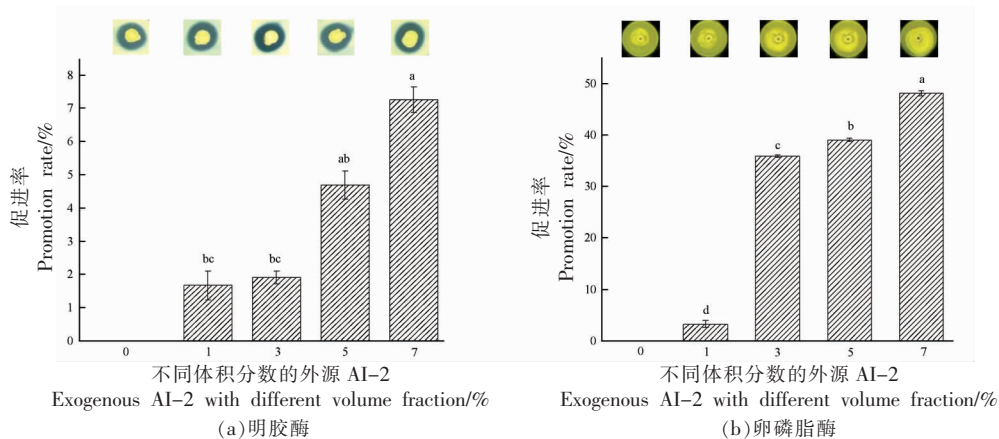
图 4 不同体积分数外源 AI-2 对菌株 VP-4 运动能力的影响

Fig.4 Effects of different volume fraction exogenous AI-2 on the motility of strain VP-4

血素是副溶血性弧菌的重要毒力因子, *luxS* 基因能够正调控溶血素的合成, 产溶血素的菌株常被认为对人类具有致病性<sup>[13,30]</sup>。因此, 探究 AI-2 信号分子与弧菌毒力因子之间的关系是控制其致病性的关键。

图 5 是添加不同体积分数的外源 AI-2 信号

分子对菌株 VP-4 多种胞外酶和溶血性的影响。如图所示, 随着外源 AI-2 信号分子添加体积分数的增大, 外源 AI-2 信号分子对副溶血性弧菌的明胶酶、卵磷脂酶、淀粉酶和溶血性都有较显著的促进作用, 添加外源 AI-2 信号分子体积分数为 7% 时的促进率分别为 7.26%, 48.15%, 12.17%, 15.23%,



(a) 明胶酶

(b) 卵磷脂酶



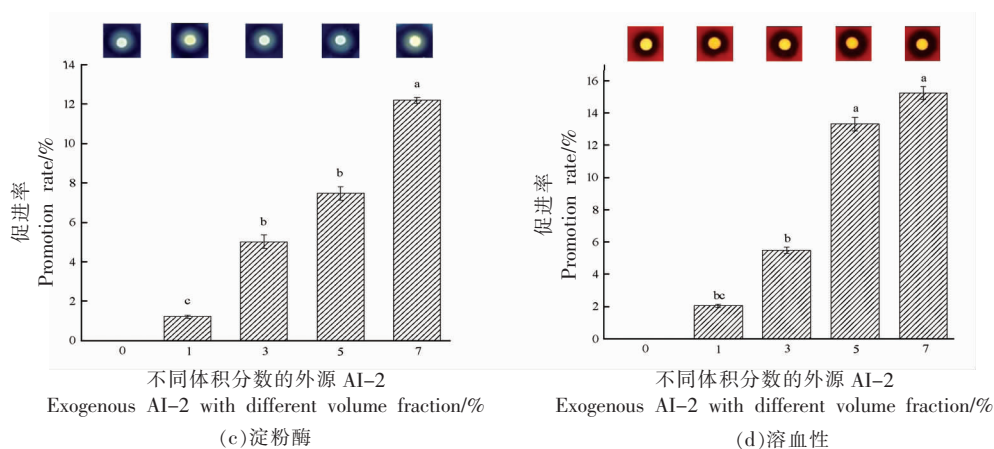


图 5 不同体积分数外源 AI-2 对菌株 VP-4 胞外酶和溶血性的影响

Fig.5 Effects of exogenous AI-2 with different volume fractions on extracellular enzymes and hemolysis of strain VP-4

其中对卵磷脂酶促进作用最显著。Zhang 等<sup>[31]</sup>研究发现, LuxS/AI-2 群体感应系统参与副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*) 的生长和生物被膜的形成, 并调控其致病性。本研究结果与其具有相似性。

### 3 结论

本文从 9 株弧菌中筛选出一株高产 AI-2 信号分子的副溶血性弧菌 VP-4。经光学显微镜和扫描电镜观察, 随着外源 AI-2 信号分子添加体积分数的增大, 菌株 VP-4 逐渐紧密聚集、厚度明显增加的生物被膜结构。添加外源 AI-2 信号分子体积分数为 7% 时, 对菌株 VP-4 生物被膜的促进率为 67.87%; 群集和泳动能力促进率分别为 35.98% 和 50.57%; 明胶酶、卵磷脂酶、淀粉酶和溶血性的促进率分别为 7.26%, 48.15%, 12.17%, 15.23%。结果表明, 添加外源 AI-2 信号分子对副溶血性弧菌的生物被膜形成能力、毒力因子和运动能力表现出显著的促进作用。本研究为探究 AI-2 信号分子与副溶血性弧菌生物被膜形成和毒力因子产生间的关系提供理论依据, 为控制副溶血性弧菌毒力提供新靶点。

### 参 考 文 献

- [1] HAN X P, CHEN Q Y, ZHANG X G, et al. Antibiofilm and anti-quorum sensing potential of *Lactiplantibacillus plantarum* Z057 against *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Foods, 2022, 11(15): 2230.
- [2] CHEN P, WANG J J, HONG B, et al. Characterization of mixed-species biofilm formed by *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10(1): 2543.
- [3] 韩翔鹏, 陈清莹, 张杏果, 等. 粪肠球菌 Z096 对副溶血弧菌生物被膜及群体感应的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(19): 167-176.
- [4] HAN X P, CHEN Q Y, ZHANG X G, et al. Inhibitory effects of *Enterococcus faecalis* Z096 on biofilm and quorum sensing of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(19): 167-176.
- [5] 刘雪晴, 吕欣然, 白凤翎, 等. 基于群体感应的弧菌生物膜形成、耐药性及其控制研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44(2): 445-452.
- [6] LIU X Q, LÜ X R, BAI F L, et al. Biofilm formation, antimicrobial resistance and control of *Vibrio* based on quorum sensing: A review[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(2): 445-452.
- [7] YANG Q, HAN Y, ZHANG X H. Detection of quorum sensing signal molecules in the family *Vibrionaceae*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(6): 1438-1448.
- [8] PEREIRA C S, THOMPSON J A, XAVIER K B. AI-2-mediated signaling in bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(2): 156-181.
- [9] LEE N, KIM M D, LIM M C. Autoinducer-2 could affect biofilm formation by food-derived *Bacillus*

- cereus*[J]. Indian Journal of Microbiology, 2021, 61(1): 66-73.
- [8] 吕欣然, 吕孟敏, 杨冰艳, 等. 高产 AI-2 信号分子乳酸菌的筛选及生物性能研究[J]. 中国食品学报, 2023, 23(7): 152-160.
- LÜ X R, LÜ M M, YANG B Y, et al. Studies on screening of lactic acid bacteria with high production of AI-2 and its biological properties[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2023, 23(7): 152-160.
- [9] WANG Y M, ZHANG Y, SONG X, et al. 1,8-Cineole inhibits biofilm formation and bacterial pathogenicity by suppressing *luxS* gene expression in *Escherichia coli*[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13(1): 988245.
- [10] 杨杰. AI-2 的体外合成及其对植物乳杆菌细菌素合成的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
- YANG J. Synthesis of AI-2 *in vitro* and effect of AI-2 on bacteriocin synthesis of *Lactobacillus plantarum* [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015.
- [11] ZHAO X, YANG F F, WANG Y R, et al. *hns* mRNA downregulates the expression of *galU* and attenuates the motility of *Salmonella enterica* serovar Typhi[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2021, 311(6): 151525.
- [12] HASAN S, AHMAD A, PURWAR A, et al. Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*[J]. Bioinformatics, 2013, 9(5): 238-242.
- [13] GUO M H, FANG Z J, SUN L J, et al. Regulation of thermostable direct hemolysin and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* by quorum-sensing genes *luxM* and *luxS*[J]. Current Microbiology, 2018, 75(9): 1190-1197.
- [14] YU T, MA M Y, SUN Y X, et al. The effect of sublethal concentrations of benzalkonium chloride on the LuxS/AI-2 quorum sensing system, biofilm formation and motility of *Escherichia coli*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, 353(18): 109313.
- [15] 李博, 顾悦, 燕彩玲, 等. 高产信号分子 AI-2 乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 185-188.
- LI B, GU Y, YAN C L, et al. Screening and identification of AI-2 high-producing lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(2): 185-188.
- [16] 李安琪, 石成龙, 钱森, 等. 副溶血性弧菌生物被膜动态形成机制的转录组分析[J]. 食品科学, 2023, 44(2): 146-155.
- LI A Q, SHI C L, QIAN S, et al. Transcriptomic analysis of the dynamic formation mechanism of *Vibrio parahaemolyticus* biofilm[J]. Food Science, 2023, 44(2): 146-155.
- [17] SUN Y C, LI Y, LUO Q, et al. LuxS/AI-2 quorum sensing system in *Edwardsiella piscicida* promotes biofilm formation and pathogenicity[J]. Infection and Immunity, 2020, 88(5): e00907-19.
- [18] YANG Q L, WANG Y, AN Q, et al. Research on the role of LuxS/AI-2 quorum sensing in biofilm of *Leuconostoc citreum* 37 based on complete genome sequencing[J]. 3 Biotech, 2021, 11(4): 189.
- [19] ZHANG Y, GU Y, WU R, et al. Exploring the relationship between the signal molecule AI-2 and the biofilm formation of *Lactobacillus sanfranciscensis* [J]. LWT, 2022, 154(2): 112704.
- [20] PALMA V, GUTIÉRREZ M S, VARGAS O, et al. Methods to evaluate bacterial motility and its role in bacterial-host interactions[J]. Microorganisms, 2022, 10(3): 563.
- [21] 张晨曦, 刘鼎阔. 细菌群集运动特性的研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(8): 3188-3203.
- ZHANG C X, LIU D K. Characterization of bacterial swarming motility: A review[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(8): 3188-3203.
- [22] 李交昆, 南美花, 吴学玲, 等. 细菌鞭毛在生理活动中的作用[J]. 生命科学, 2018, 30(6): 673-679.
- LI J K, NAN M H, WU X L, et al. The functions of bacterial flagella in physiological activities[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2018, 30(6): 673-679.
- [23] LAU T V, PUAH S M, TAN J M A, et al. Flagellar motility mediates biofilm formation in *Aeromonas dhakensis* [J]. Microbial Pathogenesis, 2023, 177(4): 106059.
- [24] DOGHRI I, CHERIFI T, GOETZ C, et al. Counteracting bacterial motility: A promising strategy to narrow *Listeria monocytogenes* biofilm in food processing industry[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12(1): 673484.
- [25] SONG S, WOOD T K. The primary physiological



- roles of autoinducer 2 in *Escherichia coli* are chemotaxis and biofilm formation[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(2): 386.
- [26] YUSOF N A M, RAZALI S A, MOHD PADZIL A, et al. Computationally designed anti-LuxP DNA aptamer suppressed flagellar assembly - and quorum sensing -related gene expression in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Biology (Basel)*, 2022, 11(11): 1600.
- [27] XIONG Q, LIU D, ZHANG H H, et al. Quorum sensing signal autoinducer-2 promotes root colonization of *Bacillus velezensis* SQR9 by affecting biofilm formation and motility[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(16): 7177-7185.
- [28] BANSAL T, JESUDHASAN P, PILLAI S, et al. Temporal regulation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence mediated by autoinducer-2[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 78(5): 811-819.
- [29] 张婷, 杨梦华. 副溶血弧菌的毒力基因表达调控的分子机制[J]. *微生物学报*, 2020, 60(7): 1345-1357.
- ZHANG T, YANG M H. Molecular mechanisms of virulence genes expression in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(7): 1345-1357.
- [30] FANG J Z, SUN D F, LI C, et al. Regulatory effects of *Shewanella putrefaciens* isolated from shrimp *Penaeus orientalis* on the virulence factors of *Vibrio parahaemolyticus* and evaluation of the role of quorum sensing in virulence factors regulation[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, 94(7): fty097.
- [31] ZHANG B Z, KU X G, ZHANG X Q, et al. The AI-2/ luxS quorum sensing system affects the growth characteristics, biofilm formation, and virulence of *Haemophilus parasuis* [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9(1): 62.

### Screening and Virulence Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* with High Production of AI-2

YUAN Shuo<sup>1</sup>, WANG Yanbo<sup>1</sup>, LIU Shuilin<sup>2</sup>, CUI Fangchao<sup>1</sup>, TAN Xiqian<sup>1</sup>, LÜ Xinran<sup>1\*</sup>,  
LI Jianrong<sup>1,3</sup>, LI Xuepeng<sup>1</sup>, DONG Hao<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Bohai University, Fresh Agricultural Products Storage and Processing and Safety Control Technology National and Local Joint Engineering Research Center, Liaoning Key Laboratory of Food Safety, Jinzhou 121013, Liaoning

<sup>2</sup>Dalian Customs Technology Center, Dalian 116034, Liaoning

<sup>3</sup>Dalian Polytechnic University Marine Food Deep Processing Key Technology Co-construction Collaborative Innovation Center, Dalian 116034, Liaoning

<sup>4</sup>Shandong Meijia Group Co., LTD., Rizhao 276800, Shandong)

**Abstract** *Vibrio parahaemolyticus* is a common foodborne pathogen whose motility, biofilm formation and virulence factor production are regulated by AI-2/LuxS quorum sensing system. In this study, *V. parahaemolyticus* with high yield of AI-2 signaling molecules was selected from nine strains *Vibrio*, and effects of exogenous AI-2 signaling molecules on biofilm, virulence factors and motility of *V. parahaemolyticus* were analyzed. The results showed that a strain of *V. parahaemolyticus* VP-4 with high production of AI-2 signaling molecules was obtained, and the promotion rates of biofilm, gelatinase, lecithin enzyme, amylase, motility, and hemolysis by adding exogenous AI-2 signaling molecules with different volume fractions (1%-7%) were 33.02%-67.87%, 1.67%-7.26%, 3.25%-48.15%, 1.21%-12.17%, 4.92%-35.98%, 4.15%-50.60%, and 2.06%-15.23%, respectively. Meanwhile, scanning electron microscope observation showed that the addition of exogenous AI-2 signaling molecules caused biofilm of *V. parahaemolyticus* to accumulate, increased in thickness and compact structure. The above results indicated that AI-2 signaling molecules could promote the formation of *V. parahaemolyticus* biofilm and the release of virulence factors, as well as enhance its motility. This study could provide a novel target for controlling the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood.

**Keywords** seafood; *Vibrio parahaemolyticus*; AI-2/LuxS; biofilm; virulence factor