

高压静电场对鮰鱼中不动杆菌与希瓦氏菌互作的影响

王晓芸^{1,2}, 高天麒^{1,3}, 孙卫青², 吴文锦¹, 汪兰^{1*}, 熊光权¹

(¹湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所 农业农村部农产品冷链物流技术重点实验室

湖北省农业科技创新中心农产品加工研究分中心 武汉 430064

²长江大学生命科学学院 湖北荆州 434025

³武汉纺织大学管理学院 武汉 430073)

摘要 为研究高压静电场(HVEF)处理斑点叉尾鮰中不动杆菌对希瓦氏菌群体感应调控的影响,对不动杆菌(AR)中酰基高丝氨酸内酯(AHLs)种类进行检测,以 HVEF 处理前、后的抗辐射不动杆菌(AR)分别与哈夫尼希瓦氏菌(SH)、腐败希瓦氏菌(SP)混合培养体系为研究对象,分析 HVEF 处理对希瓦氏菌膜电位、蛋白酶活性、生物被膜、胞外聚合物、聚集性及运动性的影响。结果表明:在混菌共培养体系中菌株 SP 和菌株 SH 虽不能产生 AHLs 信号分子,但在菌株 AR 的影响下其致病能力和生物膜形成能力明显提高。菌株 AR 分别与菌株 SH 和菌株 SP 共培养后,其蛋白酶活性分别提高了 3.29 倍和 4.43 倍,生物膜形成分别提高了 5.00 倍和 4.60 倍,聚集性提高了 1.53 倍和 2.22 倍,泳动迁移能力分别提高了 5.47 倍和 5.76 倍,群集迁移能力分别提高了 4.89 倍和 2.21 倍。菌株 AR 经 HVEF 处理后与菌株 SH 和菌株 SP 共培养体系相较于未经 HVEF 处理组,作用效果显著。本研究结果可为菌群间互作机制研究提供一定的理论参考。

关键词 斑点叉尾鮰; 群体感应; 高压静电场; 信号分子

文章编号 1009-7848(2025)02-0353-12 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2025.02.031

斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)原产于北美洲,是一种淡水经济鱼类,其水分含量高,蛋白质丰富^[1-2]。我国是世界最大的水产品生产和消费国,据 2023 中国渔业统计年鉴数据显示,斑点叉尾鮰 2022 年养殖产量约 41.62 万 t,加工量约 6.26 万 t,较 2021 年增长了 16.26%^[3],斑点叉尾鮰逐渐成为消费者喜爱的经济鱼类。斑点叉尾鮰主要以鲜销、加工鱼片为主^[4-5],其在贮藏过程中极易受微生物侵染而导致腐坏^[6],造成经济损失,甚至威胁人类健康。近年来,针对群体感应系统与食品腐败进程间的联系引起许多研究者的关注,群体感应现象几乎在所有细菌中都有体现。微生物细胞间通讯一般通过释放和接收群体感应分子(Quorum sensing molecules, QSMs)来实现^[7]。QSMs 丰富且广泛分布于天然或人工微生物群落中,其中酰基高丝氨酸内酯(Acylhomoserine lactones, AHLs)

作为 QSMs 的典型代表,强烈影响微生物的生理代谢功能。

希瓦氏菌属和不动杆菌属是斑点叉尾鮰中的重要腐败菌,它们都属于革兰氏阴性菌,具有较强腐败能力^[8],同时能黏附在食品表面并形成生物膜^[9],增加致病风险,可能引发腹膜炎、软组织感染等疾病。细菌间通过分泌信号分子进行交流,它们能调节和监测种群密度的变化,并触发毒力基因和其它感染相关表型的表达,以响应大多数小分子,如寡肽、脂肪酸衍生物或吡喃酮的信号。除此之外,还有大量生物学上重要的功能,如致病能力、运动性和许多其它功能都受到群体感应控制^[10]。

课题组前期研究表明,高压静电场(High voltage electrostatic field, HVEF)处理会使鮰鱼中不动杆菌相对丰度下降,鱼肉表现出更高的新鲜度以及更长的贮藏期,而不动杆菌的减少可能会影响希瓦氏菌的致病能力,从而延缓鱼肉腐败进程^[11]。HVEF 还会导致斑点叉尾鮰源优势腐败菌——抗辐射不动杆菌(*Acinetobacter radiore-sistens*, AR)的基因出现不同程度的上调并激发菌株 AR 体内 DNA 的损伤/修复过程^[12]。本试验对

收稿日期: 2024-02-19

基金项目: 财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-46);湖北省自然科学基金杰出青年科学基金项目(2022CFA095)

第一作者: 王晓芸,女,硕士生

通信作者: 汪兰 E-mail: lilywang_2016@163.com

菌株 AR 进行群体感应因子测定,探究菌株 AR 分别与哈夫尼希瓦氏菌(*Shewanella hafniensis*, SH)和腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*, SP)共培养过程中的相互作用以及 HVEF 处理菌株 AR 对它们的影响,为菌群间相互作用机制研究提供理论参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株

紫色色杆菌 (*Chromobacterium violaceum*, CV026),北京百欧博伟生物技术有限公司。2 株希瓦氏菌为哈夫尼希瓦氏菌(SH)和腐败希瓦氏菌(SP),1 株不动杆菌为抗辐射不动杆菌(AR),为实验室从斑点叉尾鮰中筛选出的生长优良的菌株,于湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所、农业农村部农产品冷链物流技术重点实验室保藏。所有菌株培养于 LB 培养基中,菌株 CV026 活化时需添加 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素。

1.2 试剂

无水乙醇、浓硫酸、苯酚、葡萄糖、葡萄糖、异丙醇、冰乙酸、甘油,国药集团化学试剂有限公司;甲醇(LC),美国 Sigma-Aldrich 公司;LB 肉汤培养基、LB 营养琼脂培养基,青岛海博生物技术有限公司;无菌 PBS,合肥白鲨生物科技有限公司;线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、1%结晶紫,北京索莱宝科技有限公司;常温脱脂乳,内蒙古伊利实业集团股份有限公司。

1.3 主要设备与仪器

RV10 数显旋转蒸发仪,德国 IKA 公司;HZ150L 摇床、HP300s 培养箱,武汉瑞华仪器设备有限公司;DH-9070 电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;LDZM-60 灭菌锅,上海申安医疗器械厂;BCM-1300 超净工作台,苏洁医疗器械(苏州)有限公司;SPARK 酶标仪,瑞士 Tecan Mannedorf 公司;CF16RN 低温高速离心机、F-4700 荧光分光光度计、SU8010 扫描电子显微镜,日本 HITACHI 公司;L5S 紫外分光光度计,上海仪电分析仪器有限公司;FE20pH 计、JE2002G 分析天平,瑞士 METTLER TOLEDO 公司;TX71 荧光倒置显微镜,日本 OLYMPUS 公司;SCIENTZ II D 细胞破碎仪,宁波新芝生物科技有限公司;

U3000-Q-Exactive UPLC、Q Exactive 组合式四极杆 Orbitrap 质谱仪,德国 Thermo Scientific 公司;NanoDrop2000 超微量紫外分光光度计、Hypersil Gold C18,美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

实验室所用高压静电场装置由实验室自主研发装配,如图 1^[11]所示。

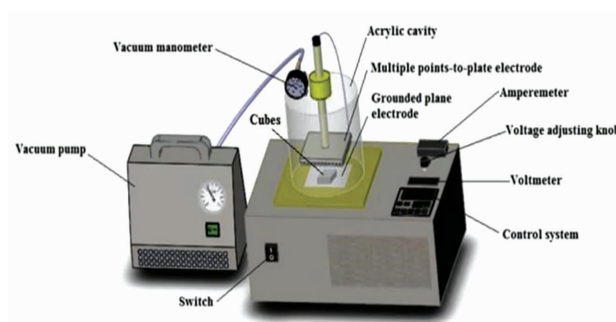


图 1 高压静电场试验装置^[11]

Fig.1 HVEF experimental device^[11]

1.4 方法

1.4.1 菌株的活化及保藏 保藏于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的菌株解冻后以 1%的接种量接种于 LB 肉汤培养基中,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r}/\text{min}$ 培养 18~24 h。之后在 LB 固体培养基划线培养 48 h,挑取单菌落于 LB 肉汤培养基中,继续转接 2~3 代即活化完成,用于后续试验。紫色色杆菌 CV026 接种于添加 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 肉汤培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r}/\text{min}$ 振荡培养 12 h,以 1%的接种量活化 2~3 代。所有的菌株活化完成后均与灭菌的 50%甘油以体积比 1:1 混合后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱继续保藏。

1.4.2 菌株 AR 中 AHLs 的检测

1.4.2.1 生物报告菌法检测 AHLs 参考 Alain 等^[13]的方法进行报告平板的制作,紫色色杆菌 CV026 以 1%的接种量接种于 LB 肉汤培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ r}/\text{min}$ 培养 12 h。按体积比 1:10 的比例与 LB 琼脂混合,摇匀后倒入已放好牛津杯的平板中,凝固后向孔中加入 200 μL /孔的待检测菌液, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h,观察颜色变化,以 $\text{C}_4\text{-HSL}$ 为阳性对照。

1.4.2.2 LC-MS 定性检测 AHLs

1) 样品制备 参考綦国红等^[14]的方法,将待测菌株在 LB 液体培养基中 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $160\text{ r}/\text{min}$ 振荡培养至一定的密度 ($\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 1.0$), $8\text{ }000\text{ r}/\text{min}$ 离

心 5 min, 将上清液用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后与等体积酸化乙酸乙酯(含 0.1% 甲酸)混合, 涡旋振荡, 静置分层后取有机相, 重复 3 次, 旋转蒸发至干, 用适量甲醇溶解烧瓶内壁上的 AHLs 信号分子, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。标准品 $\text{C}_4\text{-HSL}$ 配成质量浓度为 200 $\mu\text{g/L}$ 溶液用于 HPLC-MS 检测。所有样品及溶剂均经 0.22 μm 的有机膜过滤。上样量均为 10 μL 。

2) LC-MS 检测条件 参考马晨晨等^[15]的方法, 液相色谱条件为: Agilent XDB-C18 色谱柱(1.8 μm , 4.6 mm \times 50 mm), 流速: 0.3 mL/min, 进样量: 10 μL , 分析时间: 30 min, 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 流动相选择乙腈-水进行分析。质谱条件为: 采用 ESI(+) 离子源电喷雾, MRM 扫描模式, 离子源温度为 650 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂温度 300 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气和锥孔气为 N_2 , 碰撞气体为氩气, 锥孔气流速 3 L/min, 毛细管电压为 4 000 V, 驻留时间为 100 ms。

1.4.3 HVEF 处理菌株 AR 前期预试验中, 采用不同电压(5, 10, 20, 30 kV)、不同时间(5, 10, 15, 20, 30 min)以及不同间距(7, 8, 9, 10 cm)的 HVEF 处理条件, 进行单因素实验, 通过菌落总数对 HVEF 处理的最优减菌条件进行筛选, 最终发现, 在电压 30 kV、时间 15 min、间距 7 cm 时, 鲷鱼片的菌落总数减菌率达到 98.8%, 减菌效果显著高于其它条件以及空白对照, 为最优减菌条件, 因此后续试验均采用该试验条件。

以下操作均在超净工作台里完成, 将活化后的菌液倒入无菌平皿中, 用封口膜封好防止污染, 将平皿放置放电板正下方, 高压静电场条件为 30 kV、时间 15 min、间距 7 cm。处理后的菌株 AR 放在平皿中备用。

1.4.4 HVEF 处理菌株 AR 与希瓦氏菌共培养对希瓦氏菌的影响

1.4.4.1 混菌培养 活化后的菌株 AR 和菌株 SP、菌株 SH 培养 12 h 后, 分别用 LB 培养基稀释至 $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.1$, 然后按 1% 接种量加入到 LB 肉汤培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h。

1.4.4.2 膜电位 参照试剂盒说明书, 将菌体重悬在含不同浓度脂肽的无菌 PBS 中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 孵育 8 h, 洗涤 2 次, 用 JC-1 染色缓冲液重悬细胞。JC-1 单体的激发波长为 490 nm, 发射波长

为 530 nm; JC-1 聚合物的激发波长为 525 nm, 发射波长为 590 nm。荧光测定条件: 激发波长为 258 nm, 发射波长为 280~450 nm, 狭缝宽度为 5 nm。

1.4.4.3 蛋白酶活性 参考 Scatamburlo 等^[16]的方法, 并略作修改, 配制题解分数 15% 脱脂牛奶(105 $^{\circ}\text{C}$, 30 min 单独灭菌), 使用时取 10 mL 脱脂牛奶与 90 mL 体积分数 15% 琼脂粉(121 $^{\circ}\text{C}$, 15 min 灭菌)混匀, 倒平板, 待其完全凝固, 取 5 μL 菌株点于琼脂表面, 无菌风吹干, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 测量蛋白水解圈大小。

1.4.4.4 生物膜形成 活化后的菌株 AR 和菌株 SP、菌株 SH 培养 12 h 后, 分别用 LB 培养基稀释至 $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.1$, 加入到 96 孔板中。对于单培养每孔加入 200 μL 菌液, 对于混合培养每孔加入菌株 AR 和菌株 SP 或菌株 AR 和菌株 SH 各 100 μL , 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 72 h。每过 24 h 更换一次培养基保持菌活性, 利用结晶紫染色法^[17]测定生物膜形成量, 吸出各孔上清液, 用 200 μL PBS 缓冲溶液温柔漂洗 3 次, 去除浮游菌, 自然晾干, 加入 100 μL 甲醇固定 15 min, 室温下风干 5 min, 加入 1% 结晶紫染色 15 min, 吸出结晶紫溶液, 用 200 μL PBS 缓冲溶液温柔漂洗 3 次, 去除多余结晶紫溶液。每孔加入 33% 乙酸溶液静置 20 min 使其充分溶解, 用酶标仪测定 $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 吸光度值。

1.4.4.5 胞外多糖含量

1) 胞外多糖提取^[18] 将制备好的生物膜用 PBS 重悬, 并用细胞破碎仪(50 kHz, 5 min)超声, 在 80 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心(15 000 $\times g$, 30 min), 利用 0.22 μm 滤膜过滤后用苯酚硫酸法测定上清中的胞外多糖含量。

2) 苯酚硫酸法^[19] 以葡萄糖为标准品, 采用硫酸苯酚法绘制可溶性总糖含量标准曲线, 分别以浓度和吸光度为 X 轴和 Y 轴, 建立回归方程 $y = 9.9007x + 0.00005$, 相关系数(R^2)为 0.9995。取 0.5 mL 上述上清溶液, 加 1.5 mL 蒸馏水, 加入 1 mL 9% 苯酚溶液, 并沿管壁缓慢添加 5 mL 浓硫酸, 室温下静置 30 min 显色, 用紫外分光光度计测定 $\text{OD}_{485\text{nm}}$ 值。

1.4.4.6 聚集性 将 HVEF 处理前、后的菌株 AR 的无细胞上清液(Cell-free supernatant, CFS)以

及菌体重悬液(Cell supernatant, CS)添加至LB培养基中培养菌株SP和菌株SH,培养24h后于8 000 r/min离心10 min,用PBS重悬菌体使 $OD_{600nm} = 0.6 \pm 0.02 (A_0)$,在接下来6h中每2h取1 mL上清液测定 OD_{600nm} 值(A_t),共聚集率按式(1)计算^[20]。

$$\text{共聚集率}(\%) = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100 \quad (1)$$

1.4.4.7 运动性

1) 泳动试验 将5 mL含0.3%琼脂的LB培养基倒入6孔板。将HVEF处理或不处理的菌株AR分别与菌株SP和菌株SH混合,取5 μ L各自的单培养组和混合组刺入培养基的中心,在30 $^{\circ}$ C下培养24 h,测定迁移半径。

2) 群集试验 将5 mL含0.6%琼脂的LB培养基倒入6孔板,得到菌株AR的CFS以及CS,将HVEF处理前后的菌株AR的CFS以及CS添加至LB培养基中培养菌株SP和菌株SH,取5 μ L点在培养基中心表面,在28 $^{\circ}$ C下恒温培养24 h,测定群集半径。

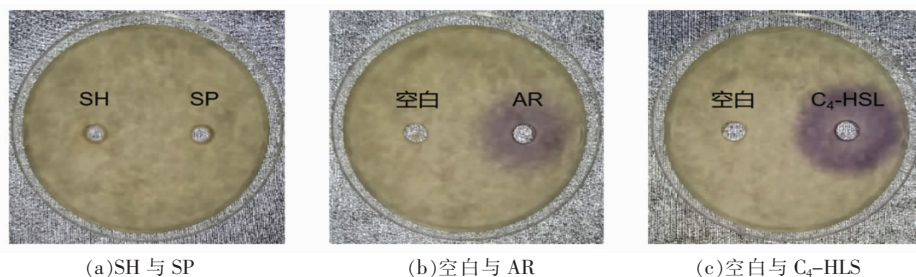


图2 生物报告菌法检测菌株中的AHLs

Fig.2 AHLs in the strains were detected by bioreporter method

2.1.2 LC-MS法 生物报告菌法灵敏度低,只能用于初步检测AHLs,不能确定细菌分泌AHLs的具体种类。因此,需采用LC-MS对菌株AR中的AHLs进一步检测。信号分子标准品离子碎片如表1所示,信号分子二级质谱图见图3。通过检测发现菌株AR中能检测到3种AHLs,分别为 C_8 -HSL(m/z 228)、 C_{12} -HSL(m/z 284)、 C_{14} -HSL(m/z 312)。郭秀春等^[22]通过GC-MS从假单胞菌中检测出3种AHLs,包括 C_6 -HSL、 C_8 -HSL和 C_{14} -HSL。赵薇等^[23]利用薄层色谱法对10株溶藻细菌进行产群体感应信号检测出有8株细菌具有产生AHLs的能力,其产物主要为 C_8 -HSL、 C_8 -O-HSL

1.5 数据处理

所有试验均重复3次,所得数据均采用Microsoft Excel 2019、Origin-2017及Graph Pad Prism 5软件进行及绘图,使用SPSS 23.0中的One-Way ANOVA对所有数据进行方差分析。

2 结果与讨论

2.1 菌株AR的AHLs检测

2.1.1 生物报告菌法 CV026是紫色杆菌ATCC31532的mini-Tn5突变体,在QS研究中被广泛用作生物传感器菌株。由于缺乏导致AHLs合成的*CviI*基因,CV026不能自行产生紫色素,外源添加C6-HSL可诱导紫色杆菌CV026产生紫色素反应^[21]。因此,可以根据CV026中的紫色素反应来评估化合物对QS的抑制作用。由图2可知,阳性对照C4-HSL以及菌株AR能引起菌株CV026产生AHLs,而菌株SH和菌株SP周围不变色,表明菌株AR能产生AHLs,SH、SP不产生AHLs或者其活性较弱不能通过该法观察到。

以及 C_{10} -HSL等3种AHLs。

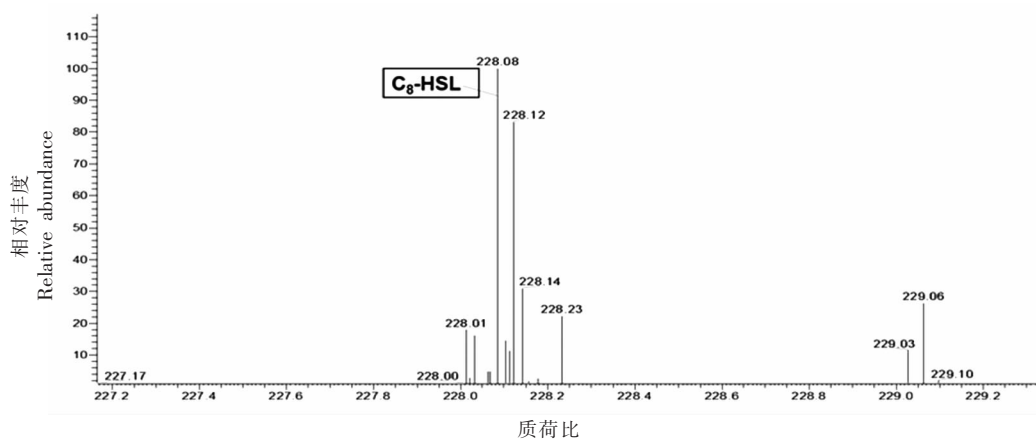
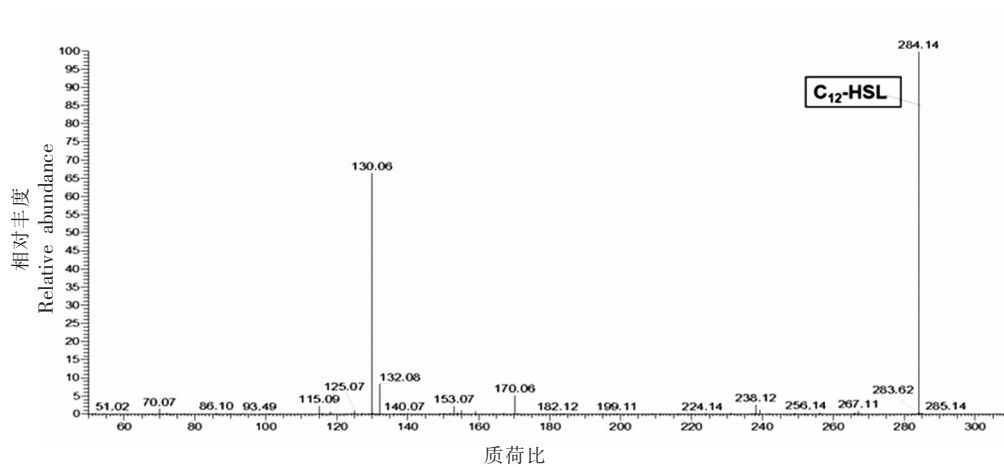
2.2 HVEF处理菌株AR与2株希瓦氏菌共培养对希瓦氏菌的影响

2.2.1 膜电位 膜电位反映细胞膜内、外的电位差,可以作为质子动能势的一部分参与到ATP合成中,因此能作为判断细胞代谢的指标之一^[24]。JC-1(一种阳离子染料)可以通过细胞膜两侧的电位差进入细胞质基质中形成聚合物能被激发出红色荧光,而未进入细胞的JC-1以单体形式存在可以被激发出绿色荧光,通过计算红色荧光强度与绿色荧光强度的比值得到细胞膜电位的绝对值^[17]。HVEF处理前、后的菌株AR对菌株SH和菌

表 1 信号分子标准品子离子

Table 1 Daughter ion of standard signal molecules

化合物	分子式	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	碰撞能量/eV
C ₄ -HSL	C ₈ H ₁₃ NO ₃	172.1	102.1, 74.1, 71.1	10
C ₆ -HSL	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	200.1	102.1, 74.1, 71.1	10
C ₈ -HSL	C ₁₂ H ₂₁ NO ₃	228.2	102.1, 74.1, 57.1	10
C ₁₀ -HSL	C ₁₄ H ₂₅ NO ₃	256.2	102.1, 74.1, 57.4	10
C ₁₂ -HSL	C ₁₆ H ₂₉ NO ₃	284.2	102.1, 74.1, 57.1	10
C ₁₄ -HSL	C ₁₈ H ₃₃ NO ₃	312.3	102.1, 74.1, 57.1	15
3-oxo-C ₆ -HSL	C ₁₀ H ₁₅ NO ₄	214.1	102.1, 74.1, 71.1	10
3-oxo-C ₈ -HSL	C ₁₂ H ₁₉ NO ₄	242.2	102.1, 74.1, 222.2, 71.2	10
3-oxo-C ₁₀ -HSL	C ₁₄ H ₂₃ NO ₄	270.2	102.1, 74.1, 57.1	15
3-oxo-C ₁₂ -HSL	C ₁₆ H ₂₇ NO ₄	298.3	102.1, 74.1, 57.1	15
3-oxo-C ₁₄ -HSL	C ₁₈ H ₃₁ NO ₄	326.3	102.1, 74.1, 68.9	15

(a) C₈-HSL 二级质谱图(b) C₁₂-HSL 二级质谱图

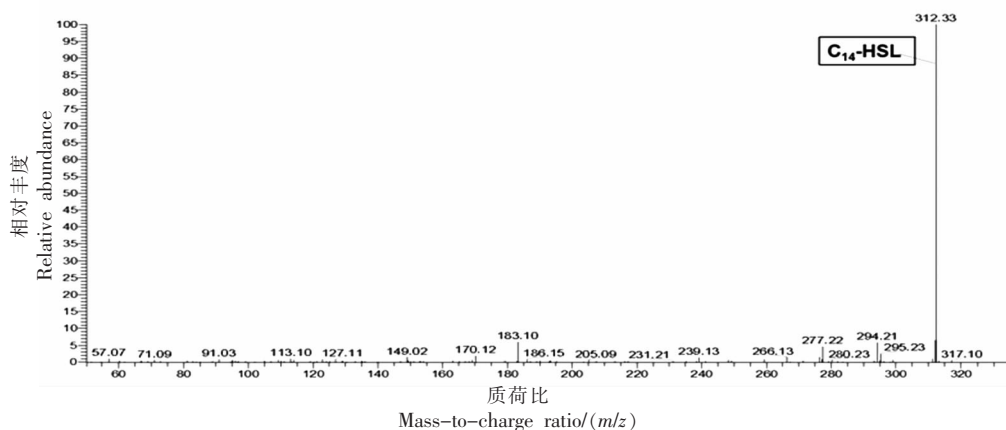
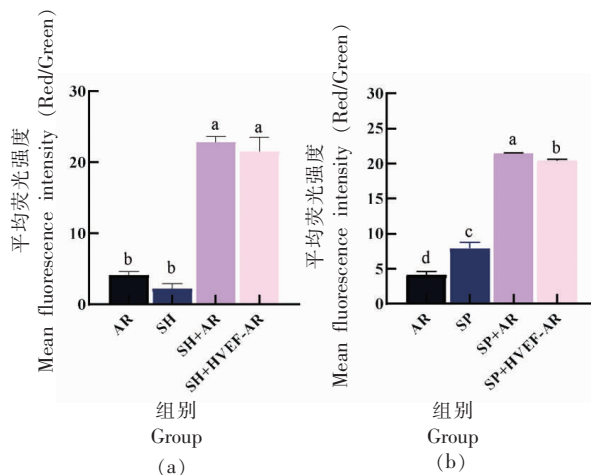
(c) C_{14} -HSL 二级质谱图

图3 抗辐射不动杆菌信号分子二级质谱图

Fig.3 Secondary mass spectra of *Acinetobacter radioresistens* signal molecules

株 SP 膜电位的影响如图 4 所示, 2 株希瓦氏菌与菌株 AR 共培养体系的 Zeta 膜电位绝对值上升, 与单培养的希瓦氏菌相比稳定性提升^[25]。值得注意的是, 经 HVEF 处理后的菌株 AR 与菌株 SH 共培养体系与未经 HVEF 处理的菌株 AR 与菌株 SH 混合培养的 Zeta 膜电位没有显著差异, 而经 HVEF 处理后的菌株 AR 与菌株 SP 共培养体系与未经 HVEF 处理的菌株 AR 与菌株 SP 混合培养的 Zeta 膜电位有明显降低 ($P < 0.05$), 可能是菌株 AR 所产生的 AHLs 对菌株 SP 的调控作用更强。

2.2.2 蛋白酶活性 水产品中的细菌通过分泌胞外蛋白酶分解蛋白质形成二甲胺和三甲胺等含氮的挥发性成分使食品产生不良的气味^[26], 并加剧水产品的腐败^[27]。采用脱脂奶平板法通过水解圈大小来判断 HVEF 处理前、后菌株 AR 对菌株 SH 以及菌株 SP 蛋白酶活性, 结果如图 5 所示。菌株 AR 自身蛋白酶活性较弱, 两株希瓦氏菌的蛋白酶活性之间虽然相差不大但都强于 AR, 而菌株 AR 共培养体系透明圈相对于单培养有明显差异 ($P < 0.05$), 表明共培养体系的胞外蛋白酶活性更高。HVEF 处理菌株 AR 后对菌株 SH 以及菌株 SP 蛋白酶分泌的促进效果明显下降 ($P < 0.05$), 而相对于对照组仍有显著效果 ($P < 0.05$)。郭建华等^[28]研究发现多种不同枯草胞杆菌共发酵培养对蛋白酶活性有显著提高。结果表明在共培养过程中 2 株希瓦氏菌蛋白酶活性受到菌株 AR 群体感应因子的调控作用, 而经 HVEF 处理后的菌株 AR 对希瓦



注: 不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$), 下同。

图4 HVEF 处理前、后的菌株 AR 对菌株 SH(a) 和菌株 SP(b)膜电位的影响

Fig.4 The effect of *A. radioresistens* with and without HVEF treatment on the Zeta membrane potential of *S. hafniensis* (a) and *S. putrefaciens* (b)

氏菌蛋白酶活性的促进作用减弱。

2.2.3 生物膜形成 细菌生物被膜主要由脂蛋白、表面蛋白、多糖基质、胞外 DNA 等组成, 依靠静电力黏连在细胞表面及细胞间^[29]。HVEF 处理前、后的菌株 AR 对菌株 SH 和菌株 SP 生物膜形成的影响如图 6 所示。菌株 AR 的生物膜形成能力明显强于 2 株希瓦氏菌 ($P < 0.05$), 并且共培养体系生物膜的形成显著提高 ($P < 0.05$), 菌株 SH 的生物被膜量由单培养的 0.16 (OD_{600nm}) 增加至混合

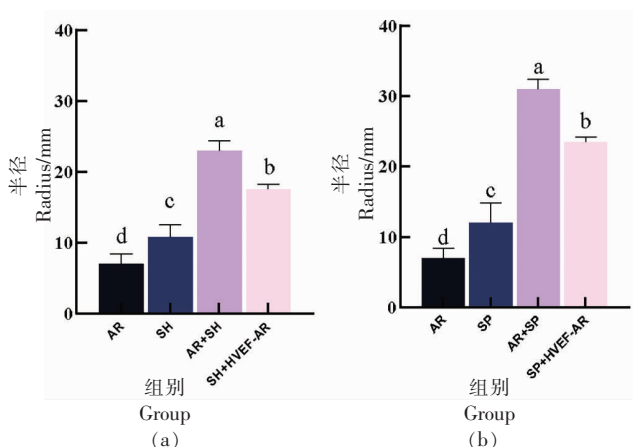


图 5 HVEF 处理前、后的菌株 AR 对菌株 SH(a) 和菌株 SP(b)蛋白酶活性的影响

Fig.5 The effect of *A. radioresistens* with and without HVEF treatment on the protease activity of *S. hafniensis* (a) and *S. putrefaciens* (b)

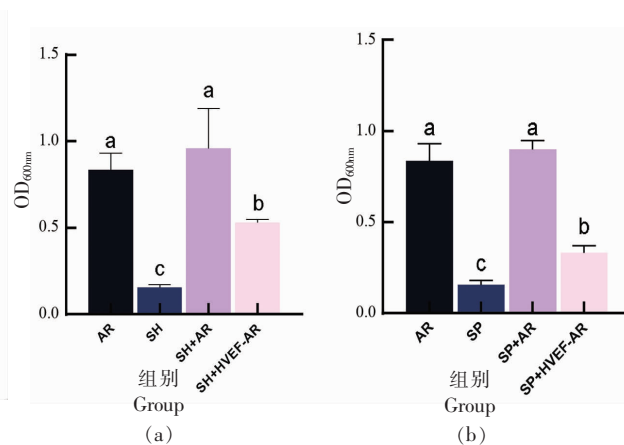


图 6 HVEF 处理前、后的菌株 AR 对菌株 SH(a) 和菌株 SP(b)生物膜形成的影响

Fig.6 The effect of *A. radioresistens* with and without HVEF treatment on the biofilm formation of *S. hafniensis* (a) and *S. putrefaciens* (b)

培养的 0.96 (OD_{600nm}), 菌株 SP 的生物被膜量由单培养的 0.16 (OD_{600nm}) 增加至混合培养的 0.90 (OD_{600nm}), 菌株 AR 经 HVEF 处理后虽然使共培养体系的生物膜形成量显著下降 ($P < 0.05$), 但仍高于对照组。菌株 SH、SP 与未经 HVEF 处理菌株 AR 混合培养体系生物被膜量的 0.96 (OD_{600nm}) 分别减少至经 HVEF 处理菌株 AR 与菌株 SH 混合培养体系的生物被膜量的 0.53 (OD_{600nm}) 和 0.33 (OD_{600nm})。

2.2.4 胞外多糖含量 胞外聚合物 (Extracellular polymeric substances, EPS) 由胞外多糖、蛋白质、胞外 DNA 和其它生物分子组成, 是生物膜细胞的骨架, 使生物膜具有稳定的结构, 并能增强细菌对宿主细胞的侵袭力以及对抗生素类药物的耐受性^[30]。HVEF 处理前、后的菌株 AR 对菌株 SH 和菌株 SP 胞外多糖的影响如图 7 所示, 2 株希瓦氏菌胞外多糖含量相似, 菌株 AR 共培养体系的菌株 SH 是单培养的 1.49 倍, 菌株 AR 共培养体系的菌株 SP 是单培养的 1.37 倍, 这表明菌株 AR 共培养体系所分泌的群体感应信号分子有效促进了希瓦氏菌的胞外多糖的分泌, 菌株 AR 经 HVEF 处理后的共培养体系对希瓦氏菌胞外多糖分泌的促进效果减弱, 甚至 HVEF 处理后菌株 AR 与菌株 SP 共培养体系与对照组相比胞外多糖含量降低。王帅涛等^[31]研究表明铜绿假单胞菌的生物膜形成以

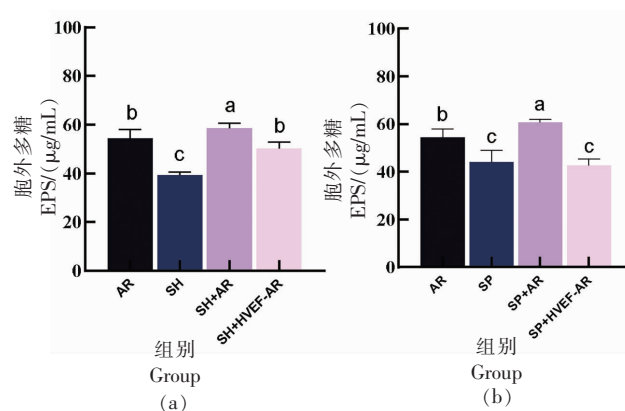
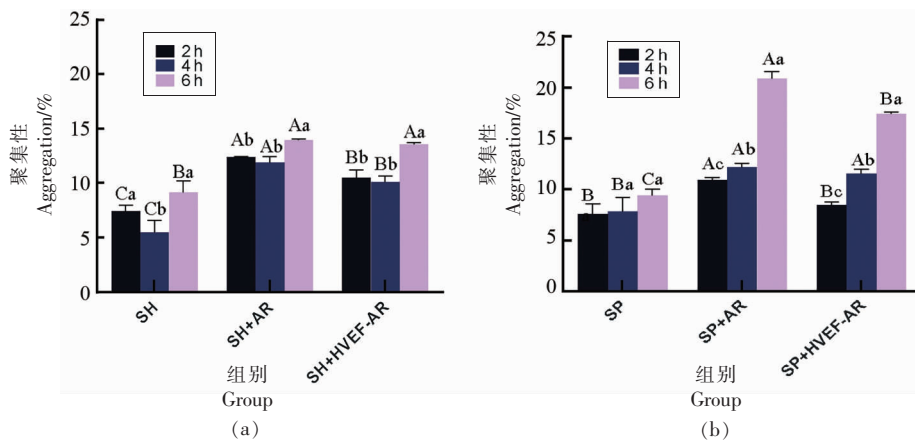


图 7 HVEF 处理前、后的菌株 AR 对菌株 SH(a) 和菌株 SP(b)胞外多糖的影响

Fig.7 The effect of *A. radioresistens* with and without HVEF treatment on the extracellular polysaccharide of *S. hafniensis* (a) and *S. putrefaciens* (b)

及各个组成成分均受群体感应因子调控。Wang 等^[32]研究表明在液体发酵中通过添加群体信号分子法尼醇能有效促进真菌 EPS 的分泌。

2.2.5 聚集性 菌株单培养的自聚集能力与多种菌株混合培养的共聚集能力与菌株的生物膜黏附性相关, 所以菌株的聚集能力越强, 生物膜形成能力越强^[33]。HVEF 处理前、后菌株 AR 对菌株 SH 以及菌株 SP 在 2, 4, 6 h 自聚集能力和共聚集能力的影响如图 8 所示。在 6 h 时 2 株希瓦氏菌与菌株 AR 混合培养的共聚集能力显著强于其单培养



注:不同大写字母表示相同时间不同菌株之间差异显著,不同小写字母表示不同时间同一菌株差异显著, $P < 0.05$ 。

图 8 HVEF 处理前、后菌株 AR 对菌株 SH(a)以及菌株 SP(b)2,4,6 h 时自聚集能力和共聚集能力的影响

Fig.8 Effects of *A. radioresistens* with and without HVEF treatment on the self-aggregation capacity and co-aggregation capacity of *S. hafniensis* (a) and *S. putrefaciens* (b) at 2, 4, 6 h

时的自聚集能力,菌株 SH 与菌株 AR 共培养的共聚集能力是菌株 SH 单培养自聚集能力的 1.53 倍,而菌株 SP 与菌株 AR 共培养的共聚集能力是菌株 SP 单培养自聚集能力的 2.22 倍,这说明菌株 SP 与菌株 AR 共培养体系对其聚集能力的促进效果更强,由于自聚集能通过影响细菌的黏附从而影响生物膜的形成。因此,混合培养自聚集提高可能是混菌生物膜比单培养菌株生物膜量更高的原因^[34]。

2.2.6 运动性 细菌的运动方式是由鞭毛介导的迁移,与在宿主表面的初期黏附及迁移相关联,并且与生物膜的形成能力呈正相关关系^[35]。细菌的群集能力是一种群体行为,是指细菌在液体培养

基内或者固体培养基表面的迁移行为,群集能力受到群体感应系统的调节;泳动能力则属于个体行为,是指细菌在固体培养基表面或半固体培养基上的迁移行为,细菌的运动行为均能促进生物膜的形成^[36]。HVEF 处理前后菌株 AR 对菌株 SH 以及菌株 SP 对运动性的影响如图 9 所示,共培养体系均能促进 2 株希瓦氏菌的群集泳动活性,共培养后体系 2 株希瓦氏菌在群集及泳动平板上的扩散直径相对于单培养的菌株 SH 以及菌株 SP 明显增加,这可能是菌株 AR 中含有一定的 AHLs,2 株希瓦氏菌分别感受并消耗菌株 AR 的 AHLs 从而加强了其群集泳动活性^[37]。经 HVEF 处理后 2 株希瓦氏菌与菌株 AR 共培养体系的运动

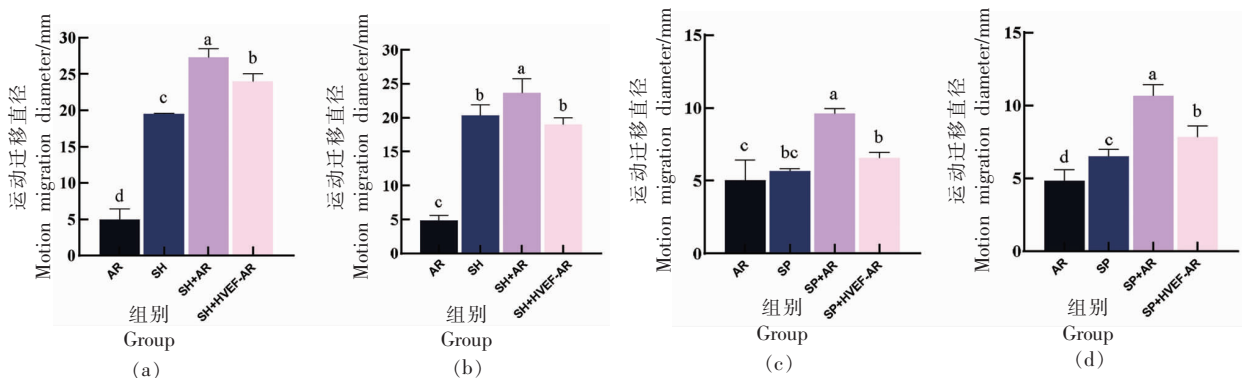


图 9 HVEF 处理前、后菌株 AR 对菌株 SH 泳动迁移能力(a)和群集迁移能力(b)以及菌株 SP 泳动迁移能力(c)

和群集迁移能力(d)的影响

Fig.9 The effects of *A. radioresistens* with and without HVEF treatment on the migration ability (a) and swarm migration ability (b) of *S. hafniensis* and the migration ability (c) and swarm migration ability (d) of *S. putrefaciens*

性均有不同程度的降低,可能是因为 HVEF 对菌株 AR 的生长受到了抑制。

3 结论

本研究通过紫色杆菌 CV026 为报告菌株的平板打孔法及利用液相色谱-质谱技术 (LC-MS) 检测菌株 AR 能产生 C₈-HSL、C₁₂-HSL、C₁₄-HSL 等多种信号分子。菌株 AR 分别与菌株 SH 和菌株 SP 混合培养,发现菌株 AR 的添加对 2 株希瓦氏菌的生长、蛋白酶分泌、生物膜形成、聚集性以及运动性都具有一定的促进效果。此外,菌株 AR 经 HVEF 处理后,共培养体系各指标的促进效果均有所减弱。结果表明,2 株希瓦氏菌都能受到菌株 AR 的调控作用,从而促进其生物学上的重要功能,而 HVEF 处理能在一定程度上延缓该促进效果,抑制混菌共培养的相互作用机制。本文研究了斑点叉尾鲮源抗辐射不动杆菌对哈夫尼希瓦氏菌以及腐败希瓦氏菌的相互作用影响机理,利用 HVEF 处理抗辐射不动杆菌从而探究 HVEF 对共培养过程中菌群相互作用的影响机制,为探究水产品优势腐败菌及共生菌的致腐机制提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] REFAEY M M, LI D, TIAN X, et al. Physiological responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) reared at different stocking densities in a recirculating aquaculture system[J]. *Aquaculture*, 2022, 557: 738329.
- [2] ZHANG J Z, WANG Z Q, SHI Y, et al. Protective effects of chlorogenic acid on growth, intestinal inflammation, hepatic antioxidant capacity, muscle development and skin color in channel catfish *Ictalurus punctatus* fed an oxidized fish oil diet[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2023, 134(11): 108511.
- [3] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会编制. 2023 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 109. Fisheries Administration of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National aquatic Technology extension Station, China Fisheries Association. 2023 China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2023: 109.
- [4] MOUSA A A, RAMACHANDRAN R, OZDEMIR O, et al. Dietary trans-cinnamaldehyde improves oxidative stress response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) following *Edwardsiella ictaluri* infection[J]. *Aquaculture*, 2021, 532(7): 735985.
- [5] 姜启兴, 聂程芳, 高沛, 等. 斑点叉尾鲮鱼软罐头杀菌工艺研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(3): 97-102. JIANG Q X, NIE C F, GAO P, et al. Study on sterilization technology of soft canned channel catfish[J]. *Journal of Food and Biotechnology*, 2021, 40(3): 97-102.
- [6] 陶晓雅, 杨振泉, 张辉, 等. 不同贮藏温度下斑点叉尾鲮鲜度及优势腐败菌群变化规律研究[J]. *食品科技*, 2016, 41(12): 97-102. TAO X Y, YANG Z Q, ZHANG H, et al. Freshness and dominant spoilage flora varying patterns for *Ictalurus punctatus* under the different storage temperatures[J]. *Food Science and Technology*, 2016, 41(12): 97-102.
- [7] LIU L L, ZENG X Y, ZHENG J, et al. AHL-mediated quorum sensing to regulate bacterial substance and energy metabolism: A review[J]. *Microbiol Res*, 2022, 262(12): 127102.
- [8] 郭全友, 修艳辉, 姜朝军, 等. 环境因子对大黄鱼腐败希瓦氏菌生长影响的计数法分析[J]. *农业机械学报*, 2016, 47(10): 2507-2317. GUO Q Y, XIU Y H, JIANG Z J, et al. Effect of environmental factors on growth of *Shewanella putrefaciens* based on different counting methods[J]. *Transactions of Agricultural Machinery*, 2016, 47(10): 2507-2317.
- [9] YI Z K, YAN J, DING Z Y, et al. The HD-GYP domain protein of *Shewanella putrefaciens* YZ08 regulates biofilm formation and spoilage activities[J]. *Food Res Int*, 2022, 157(11): 111466.
- [10] GALLOWAY W, HODGKINSON J T, BOWDEN S D, et al. Quorum sensing in gram-negative bacteria: Small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways[J]. *Chem Rev*, 2011, 111(1): 28-67.
- [11] HUANG H, SUN W Q, XIONG G Q, et al. Effects of HVEF treatment on microbial communities and physicochemical properties of catfish fillets during chilled storage[J]. *LWT*, 2020, 131: 109667.

- [12] HUANG H, XIONG G Q, SHI L, et al. Application of HVEF treatment in bacteriostasis against *Acinetobacter radioresistens*[J]. Food Control, 2021, 124: 107914.
- [13] ALAIN K Y, TAMFU A N, KUCUKAYDIN S, et al. Phenolic profiles, antioxidant, anti-quorum sensing, antibiofilm and enzyme inhibitory activities of selected Acacia species collected from Benin[J]. LWT-Food Sci Technol, 2022, 171(14): 114162.
- [14] 綦国红, 董明盛, 吴胜明, 等. HPLC-MS法检测 *N*-酰基-高丝氨酸内酯类信号分子[J]. 分析测试学报, 2007, 26(3): 417-419.
- QI G H, DONG M S, WU S M, et al. Determination of signal molecules *N*-acyl-homoserine lactones by HPLC-MS[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2007, 26(3): 417-419.
- [15] 马晨晨, 李柏林, 欧杰, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定细菌群体感应效应的 11 种 AHLs 类信号分子[J]. 分析化学, 2010, 38(10): 1428-1432.
- MA C C, LI B L, OU J, et al. Simultaneous determination of 11 kinds of AHLs signal molecules of quorum sensing effect by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38(10): 1428-1432.
- [16] SCATAMBURLO T M, YAMAZI A K, CAVICCHIOLI V Q, et al. Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk[J]. J Dairy Sci, 2015, 98(2): 759-764.
- [17] CHAPPELL T C, NAIR N U. Engineered *Lactobacilli* display anti-biofilm and growth suppressing activities against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. npj Biofilms Microbiomes, 2020, 6(1): 10.
- [18] 纪亚楠. 环境胁迫对乳酸菌产生物膜、信号分子 AI-2 及胞外多糖的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- JI Y N. The effects of environmental stress on the production of biofilm, signal molecule AI-2 and EPS in lactic acid bacteria[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2020.
- [19] ZHANG R Y, NEU T R, BLANCHARD V, et al. Biofilm dynamics and EPS production of a thermoacidophilic bioleaching archaeon[J]. New Biotech, 2019, 51: 21-30.
- [20] 杨露, 覃书漫, 李志洪, 等. 丁香酚对解淀粉芽孢杆菌气液界面生物膜的抑制作用[J]. 食品科学技术学报, 2023, 41(1): 88-98.
- YANG L, QIN S M, LI Z H, et al. Inhibitory effect of eugenol on biofilm of *Bacillus amylolique* faciens formed at air-liquid interface[J]. Journal of Food Science and Technology, 2023, 41(1): 88-98.
- [21] MCCLEAN K H, WINSON M K, FISH L, et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones[J]. Microbiology (Reading, England), 1997, 143(12): 3703-3711.
- [22] 郭秀春, 郑立, 张魁英, 等. 气相色谱-质谱法检测细菌中 *N*-酰基高丝氨酸内酯类信号分子[J]. 分析测试学报, 2012, 31(3): 347-350.
- GUO X C, ZHENG L, ZHANG K Y, et al. Determination of *N*-acyl-homoserine lactones signal molecules by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2012, 31(3): 347-350.
- [23] 赵薇, 许彤骏, 王喻元, 等. 溶藻细菌的筛选及群体感应信号对其活力的调节作用[J]. 生物加工过程, 2023, 21(4): 461-470.
- ZHAO W, XU T J, WANG Y Y, et al. Screening the algicidal bacteria from phycosphere environment and evaluate their algicidal activity under quorum sensing regulation[J]. Journal of Bioprocess Engineering, 2023, 21(4): 461-470.
- [24] 韩迎洁. 柠檬烯对单增李斯特菌抑菌活性和机制研究及其应用[D]. 海口: 海南大学, 2021.
- HAN Y J. Antibacterial activity and mechanism of limonene against *Listeria monocytogenes* and its application[D]. Haikou: Hainan University, 2021.
- [25] WYNESS A J, PATERSON D M, DEFEW E C, et al. The role of zeta potential in the adhesion of *E coli* to suspended intertidal sediments[J]. Water Res, 2018, 142: 159-166.
- [26] ZHANG C Y, BIJL E, SVENSSON B, et al. The extracellular protease AprX from *Pseudomonas* and its spoilage potential for UHT milk: A review[J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2019, 18(4): 834-852.
- [27] 江京洋, 韦旭航, 朱军莉, 等. 大黄鱼来源波罗的海希瓦氏菌 SB-19 的 *hfq* 基因功能分析[J]. 食品科学, 2022, 43(8): 135-141.
- JIANG J Y, WEI X H, ZHU J L, et al. Functional evaluation of *hfq* gene in *Shewanella baltica* SB-

- 19 isolated from large yellow croaker[J]. Food Science, 2022, 43(8): 135–141.
- [28] 郭建华, 赵健乔, 曹政. 几种芽孢杆菌共培养对产蛋白酶的影响[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(9): 11–12.
- GUO J H, ZHAO J Q, CAO Z, et al. Influence of several *Bacillus* co-fermentation on protease activity [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2015, 43(9): 11–12.
- [29] RAMACHANDRAN G A N S, CHACKARAVARTHY G. Chitosan/silver nanocombination enhanced the biofilm eradication in biofilm forming gram positive *S. aureus*[J]. Journal of King Saud University – Science, 2023, 35(4): 102597.
- [30] 刘佳文, 吴倩, 张昭寰, 等. 假单胞菌生物被膜核心胞外多糖生物合成系统研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2022, 49(2): 273–283.
- LIU J W, WU Q, ZHANG Z H, et al. Research progress on extracellular polysaccharide biosynthesis system of *Pseudomonas* biofilm core[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2022, 49(2): 273–283.
- [31] 王帅涛, 高倩倩, 成娟丽, 等. 铜绿假单胞菌生物被膜组成及其受群体感应系统和 c-di-GMP 调控的研究进展[J]. 微生物学报, 2021, 61(5): 1106–1122.
- WANG S T, GAO Q Q, CHENG J L, et al. Research progress on the composition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and its regulation by quorum sensing system and c-di-GMP[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(5): 1106–1122.
- [32] WANG X L, ZHANG L L, CHEN N, et al. The effects of quorum sensing molecule farnesol on the yield and activity of extracellular polysaccharide from *Grifola frondosa* in liquid fermentation[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 191: 377–384.
- [33] ZHANG G J, LU M, LIU R M, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation and virulence by *Lactobacillus plantarum* K41 isolated from traditional Sichuan pickles[J]. Front Microbiol, 2020, 11(12): 774.
- [34] LANDO V V N Z, MORONI L S. Functional characterization of *Lactobacilli* strains with antimicrobial activity against *Salmonella* spp. and cell viability in fermented dairy product[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2023, 47: 102605.
- [35] GROBAS I, POLIN M, ASALLY M. Swarming bacteria undergo localized dynamic phase transition to form stress-induced biofilms [J]. eLife, 2021, 10(22): e62632.
- [36] LIU L, YAN Y P, FENG L F, et al. Quorum sensing *asaI* mutants affect spoilage phenotypes, motility, and biofilm formation in a marine fish isolate of *Aeromonas salmonicida* [J]. Food Microbiol, 2018, 76: 40–51.
- [37] ATKINSON S, CHANG C Y, SOCKETT R E, et al. Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(4): 1451–1461.

Studies on the Interaction between *Acinetobacter* and *Shewanella* in Channel Catfish by High Voltage Electrostatic Field

WANG Xiaoyun^{1,2}, GAO Tianqi^{1,3}, SUN Weiqing², WU Wenjin¹, WANG Lan^{1*}, XIONG Guangquan¹
(¹Key Laboratory of Cold Chain Logistics Technology for Agro-product, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Agro-product Processing and Nuclear Agricultural Technology, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Agro-product Processing Research Sub-center of Hubei Innovation Center of Agriculture Science and Technology, Wuhan 430064

²College of Life Science, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei

³School of Management, Wuhan Textile University, Wuhan 430073)

Abstract This study aimed to explore the influence of high voltage electrostatic field (HVEF) treatment on the quorum sensing regulation of *Shewanella* mediated by *Acinetobacter* in channel catfish. The research involved the identification of acyl homoserine lactones (AHLs) types within *Acinetobacter*. The experimental design centered on mixed culture systems

comprising radiation-resistant *Acinetobacter* (AR) by HVEF treatment, alongside *Shewanella hafniensis* (SH) and *Shewanella putrefaciens* (SP). A comprehensive analysis was conducted to assess the impact of HVEF treatment on various physiological attributes of *Shewanella*, including membrane potential, protease activity, biofilm development, extracellular polymeric substance production, cellular aggregation, and motility. In the mixed co-culture system, although strain SP and strain SH could not produce AHLs signaling molecules, they could be promoted by strain AR to improve the motility and biofilm forming ability. Upon co-cultivation of strain AR with strains SH and SP, a marked enhancement in various indicators was observed: protease activity escalated by 3.29-fold and 4.43-fold, biofilm formation was augmented by 5.00-fold and 4.60-fold, cellular aggregation was bolstered by 1.53-fold and 2.22-fold, swimming motility surged by 5.47-fold and 5.76-fold, and swarming motility was amplified by 4.89-fold and 2.21-fold, respectively. The co-culture system of strain AR treated with HVEF and strain SH and strain SP showed significant effect compared with the group treated without HVEF. The results of this study can provide a theoretical basis for the mechanism of bacterial interaction.

Keywords channel catfish (*Ictalurus punctatus*); quorum sensing; high voltage electrostatic field; signaling molecule