

## 研究报告



## 黄河鲤水产细菌的分离及其毒力因子和群体感应信号分子的检测

景如贤 郑亚萌 张宁 张志宇 李祎\*

河南师范大学生命科学学院 河南 新乡 453007

**摘要:**【背景】水产细菌病害制约水产养殖业健康发展,群体感应与细菌毒力因子的产生密切相关,群体感应调控细菌的毒力因子特性值得进一步研究。【目的】探究群体感应与黄河鲤细菌病害的关系,明确群体感应对细菌毒力因子特性的影响。【方法】通过 16S rRNA 基因测序并构建系统进化树确定筛选菌株的进化地位,通过脱脂牛奶平板法和偶氮酪蛋白法检测菌株胞外蛋白酶活力,采用结晶紫染色法对菌株的生物膜形成能力进行测定,通过报告菌株 BB170 和 CV026 分别测定菌株产信号分子 AI-2 和高丝氨酸内酯的能力,外源添加高丝氨酸内酯检测信号分子对菌株胞外蛋白酶活力和生物膜形成能力的影响。【结果】哈夫尼亚菌(*Hafnia* sp.) Z11 和气单胞菌(*Aeromonas* sp.) Z12 具有高水平的胞外蛋白酶活力和生物膜形成能力,能够分泌 AHLs 信号分子且具有菌体密度依赖性。外源添加 HSL 对菌株毒力因子特性有不同程度的影响,外源添加高浓度的 *N*-丁酰基高丝氨酸内酯(C4-HSL)和 *N*-己酰基高丝氨酸内酯(C6-HSL)能够分别提高菌株 Z11 和 Z12 的胞外蛋白酶活力和生物膜形成能力。【结论】高浓度群体感应信号分子 AHLs 对哈夫尼亚菌和气单胞菌胞外蛋白酶活性有促进作用,说明该 2 种菌的群体感应现象可能会影响其毒力。

**关键词:** 群体感应, 哈夫尼亚菌, 气单胞菌, 胞外蛋白酶活力, 生物膜

## Detection of virulence factors and quorum sensing signal molecules of aquatic bacteria from Yellow River carp

JING Ruxian ZHENG Yameng ZHANG Ning ZHANG Zhiyu LI Yi\*

College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxian, Henan 453007, China

**Abstract:** [Background] Aquatic pathogens restrict the healthy development of aquaculture; quorum sensing is closely related to the production of virulence factors. The characteristics of virulence factors regulated by quorum sensing is worthy of further study. [Objective] To explore the relationship between quorum sensing and bacterial diseases of Yellow River carp, and clarify the influence of quorum sensing on the characteristics of virulence factors. [Methods] The 16S rRNA gene was sequenced and the phylogenetic tree was constructed to determine the evolutionary status of the selected strains. The activity

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (32000073); Key Scientific Research Project of Colleges and Universities in Henan Province (21A180011)

\*Corresponding author: Tel: 86-373-3326559; E-mail: liyi@htu.edu.cn

Received: 16-08-2020; Accepted: 12-10-2020; Published online: 18-11-2020

基金项目: 国家自然科学基金(32000073); 河南省高等学校重点科研项目(21A180011)

\*通信作者: Tel: 0373-3326559; E-mail: liyi@htu.edu.cn

收稿日期: 2020-08-16; 接受日期: 2020-10-12; 网络首发日期: 2020-11-18

of extracellular protease was detected by skim milk plate method and azo casein method. The bacterial biofilm forming ability was determined by crystal violet staining. The producing ability of AI-2 and AHLs was determined by reporter strain BB170 and CV026, respectively. The effects of exogenous HSLs on extracellular protease ability and biofilm formation ability were detected. **[Results]** *Hafnia* sp. Z11 and *Aeromonas* sp. Z12 were evidenced with high levels of extracellular protease activity and biofilm formation ability, and could secrete AHLs signal molecules, which were density dependent. High concentration of C4-HSL and C6-HSL could increase the extracellular protease activity and biofilm formation activity of strain Z11 and Z12, respectively. **[Conclusion]** High concentration of quorum sensing factors (AHLs) can promote the extracellular protease activity of *Hafnia* sp. Z11 and *Aeromonas* sp. Z12, suggesting that the quorum sensing of these two bacteria may affect their virulence.

**Keywords:** quorum sensing, *Hafnia* sp. Z11, *Aeromonas* sp. Z12, extracellular protease activity, biofilm

黄河流域河南段气候温和, 年日照时间和鱼类生长期较长, 鱼类饲料丰富, 是发展渔业生产的“温床”<sup>[1]</sup>。黄河鲤是该区域重要的养殖品种, 其肉质细嫩鲜美、性状优异, 具有较高的经济价值和营养价值。随着自然环境的恶化和养殖密度的增加, 黄河鲤的养殖环境不断被破坏, 特别是细菌性疾病日益增多, 给黄河鲤养殖业带来不可忽视的影响, 造成巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。细菌病害的防治成为黄河鲤养殖健康发展亟待解决的问题<sup>[3]</sup>。

细菌可以产生毒性很强的毒力因子, 如胞外蛋白酶、生物膜、外毒素和黏附因子等, 而细菌的致病性与其毒力因子的表达密不可分。细菌毒力因子的产生与很多因素有关, 随着研究的深入, 人们发现细菌之间存在一种信息交流机制, 称为群体感应(Quorum Sensing, QS), 其主要依赖于小分子的自体诱导物(Autoinducers, AIs)的生成、分泌和响应, 以激活或抑制特定的靶基因表达, 从而调控细菌中的各种生理过程, 包括共生、发光、毒力因子表达、抗生素合成和生物被膜形成等; 细菌的一些毒力因子特性, 如胞外蛋白酶的产生、生物被膜、毒力因子表达等也受到QS系统的调控<sup>[4]</sup>。目前发现的细菌QS系统主要有3类: 革兰氏阴性菌中由不同长度酰基侧链的高丝氨酸内酯(N-Acyl Homoserine Lactone, AHLs)介导的LuxI/R型信息系统<sup>[5]</sup>; 革兰氏阳性细菌中寡肽(Autoinducing Peptides, AIPs)介导的信息系统<sup>[6]</sup>; 在革兰氏阳性、阴性菌都存在, 可用于细

菌种间交流的LuxS/AI-2型的信息系统<sup>[7]</sup>。因此, 探究黄河鲤细菌的毒力因子特性与群体感应之间的关联, 对于水产细菌病害的防控有重要意义。

本研究从黄河鲤组织中筛选出多株细菌, 分别对其胞外蛋白酶产量、生物膜形成能力、群体感应信号分子类型进行研究, 并进一步探究群体感应信号分子与毒力因子特性之间的关联, 以期在水产细菌病害的研究奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

哈维氏弧菌 BB170 由中国农业科学院上海兽医研究所韩先干研究员惠赠, 于 AB 培养基培养<sup>[7]</sup>; 紫色杆菌 CV026 由清华大学深圳国际研究生院周进研究员惠赠, 于 LB 培养基中培养。

### 1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨和酵母提取物, Oxoid 公司; 脱脂奶粉和偶氮酪蛋白, 上海碧云天生物技术公司; *N*-丁酰基高丝氨酸内酯(C4-HSL)、*N*-己酰基高丝氨酸内酯(C6-HSL)和 *N*-辛酰基高丝氨酸内酯(C8-HSL), Sigma-Aldrich 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, TaKaRa 公司。

超净工作台, 苏州智净净化设备有限公司; 酶标仪, 郑州金友宁仪器有限公司; 紫外分光光度计, 上海仪电分析仪器有限公司; 光学显微镜, Olympus 公司; PCR 仪和凝胶成像系统, Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 菌株筛选

称取黄河鲤背部、腹部和尾部肌肉等不同组织匀浆, 加入无菌生理盐水, 获得细菌样品。利用梯度稀释法将样品分别涂布在 LB 固体培养基表面, 置于 37 °C 培养 3–5 d。挑取不同形态单菌落于 LB 固体平板划线, 置于 37 °C 培养, 重复该步骤直至得到纯培养。

#### 1.3.2 菌株鉴定

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取筛选菌株的基因组 DNA, 利用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3') PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因。PCR 反应体系: 引物终浓度为 0.2  $\mu$ mol/L, dNTPs 终浓度为 0.2 mmol/L, 10 $\times$ PCR Buffer 5  $\mu$ L, *Taq* 酶 1 U, ddH<sub>2</sub>O 补至 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。利用胶回收试剂盒将 PCR 产物纯化回收, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果提交 NCBI 数据库进行 BLAST 序列比对, 选取与所测序列相似性较高的种或属。应用 ClustalX 和 MEGA 4.0 生物软件<sup>[8]</sup>, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

#### 1.3.3 脱脂牛奶平板法检测胞外蛋白酶活性

配制含有 1% 脱脂奶粉的 LB 固体培养基, 在平板未完全凝固之前垂直插入牛津杯。将培养在含 1% 脱脂奶粉 LB 液体培养基的菌种, 用无菌的 LB 液体培养基稀释菌液至  $OD_{600}$  为 0.85–1.00 左右, 将 200  $\mu$ L 稀释后的菌液加入至固体平板的牛津杯中培养。以添加无菌 LB 培养液的平板作为阴性对照, 将平板放置于 37 °C 培养, 每隔 24 h 检测其水解圈直径大小。

#### 1.3.4 偶氮酪蛋白法检测胞外蛋白酶活性

将上述有水解圈的菌株进一步通过偶氮酪蛋白法检测胞外蛋白酶活性<sup>[9]</sup>。将 37 °C、160 r/min 摇床培养的菌株发酵液经 8 000 r/min 离心 5 min, 除去菌体后收集上清。取 100  $\mu$ L 无菌上清加入 100  $\mu$ L

的偶氮酪蛋白溶液(由 50 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制, 终浓度为 0.5%), 并置于 37 °C 反应 2 h。加入 500  $\mu$ L 10% (质量体积分数) 三氯乙酸溶液终止反应, 室温放置 30 min。反应液于 8 000 r/min 离心 5 min 后取上清 500  $\mu$ L, 加入 500  $\mu$ L 1 mol/L NaOH 溶液混匀, 以只含有 500  $\mu$ L Tris-HCl 缓冲液和 500  $\mu$ L 菌株无菌上清液的反应液作为空白对照, 测定  $OD_{440}$ 。每小时  $OD_{440}$  变化 0.001 定义为 1 个酶活力单位(1 U)。每株菌重复 3 次试验。

#### 1.3.5 生物膜形成能力的测定

采用结晶紫染色法对上述菌株的生物膜形成能力进行测定<sup>[10]</sup>。将 37 °C、160 r/min 摇床培养过夜的菌株发酵液稀释至  $OD_{600}$  为 0.85, 按 2% 接种量分别接入每孔盛有 1 mL LB 的 24 孔板中, 37 °C 培养 48 h。弃去各孔培养基, 蒸馏水洗涤 3 次, 室温干燥 30 min 以上, 并于 65 °C 固定 15 min。加入 1 mL 结晶紫染色液染色 30 min, 吸弃结晶紫染液, 用去离子水将结晶紫冲洗干净至无色, 室温干燥。加入 1 mL 95% 乙醇溶液脱色 30 min 后, 用酶标仪测定其  $OD_{595}$  值。

#### 1.3.6 群体感应信号分子 AI-2 的检测

采用哈维氏弧菌 BB170 生物发光法定量分析检测上述菌株的 AI-2 信号分子活性<sup>[11]</sup>。将哈维氏弧菌 BB170 接种至 AB 培养基中, 30 °C、160 r/min 摇床培养过夜, 检测其  $OD_{600}$  为 1.0–1.2 时, 将培养过夜的 BB170 按 1:5 000 比例稀释至新鲜的 AB 培养基中, 将培养过夜的待测菌株培养液按 1:100 比例稀释至新鲜的 LB 培养基中继续培养至  $OD_{600}$  为 0.6–0.8 左右, 8 000 r/min 离心 10 min 后取上清, 将上清液通过 0.2  $\mu$ m 滤膜过滤至无菌的离心管中。将无菌上清与稀释后的哈维氏弧菌液按 1:9 的比例混合均匀, 将在 AB 培养基中培养过夜的哈维氏弧菌 BB170 的无菌上清和稀释后的哈维氏弧菌同样按 1:9 的比例混匀, 以此作为阳性对照, 以灭菌的 AB 培养基作为阴性对照。将上述各组于 30 °C 通气培养 4 h, 利用光度计检测每个样品的生物体发光值, 以此表征 AI-2 的活性, 每株菌重复

3 次实验。

### 1.3.7 群体感应信号分子 AHLs 的检测

采用报告平板划线法,检测上述菌株产 AHLs 信号分子的能力<sup>[12]</sup>。将待测菌株和报告菌株紫色杆菌 CV026 分别接种至 LB 培养基中于 37 °C、160 r/min 摇床培养过夜。分别将待测菌株与紫色杆菌 CV026 在 LB 固体培养基上进行平行划线,紫色杆菌 CV026 在上,待测菌株在下,37 °C 恒温培养。以菌株 CV026 本身作为阴性对照,每隔 24 h 观察结果。

### 1.3.8 菌株分泌 AHLs 动力学

将待测菌株接种到 LB 液体培养基中,于 37 °C、160 r/min 摇床培养,每隔一段时间取样(0、4、8、12、24、36 和 48 h),用酶标仪测定其  $OD_{600}$  值,并将样品经 8 000 r/min 离心 5 min 取上清液。将含有检测菌株 CV026 的 LB 营养琼脂倒入底层铺有琼脂的平板中,用牛津杯打孔,每孔加入 200  $\mu$ L 上清液,37 °C 培养 24 h,分别测量各组中 CV026 的变色直径。

### 1.3.9 外源 AHLs 对胞外蛋白酶的影响

将待测菌株于 37 °C、160 r/min 培养过夜后接种于含有 1%脱脂奶粉的 LB 液体培养基中,分别加入终浓度为 10  $\mu$ mol/L 和 50  $\mu$ mol/L 的外源 C4-HSL、C6-HSL 和 C8-HSL (均溶解于二甲基亚砜),以添加二甲基亚砜组作为阴性对照,37 °C 培养。按照偶氮酪蛋白法测定各组胞外蛋白酶活性。

### 1.3.10 外源 AHLs 对生物膜的影响

将 37 °C、160 r/min 摇床培养过夜的菌株发酵液稀释至  $OD_{600}$  为 0.85,按 2%接种量分别接入每孔盛有 1 mL LB 的 24 孔板中,分别加入终浓度为 10  $\mu$ mol/L 和 50  $\mu$ mol/L 的外源 C4-HSL、C6-HSL 和 C8-HSL (均溶解于二甲基亚砜),以添加二甲基亚砜组作为阴性对照,37 °C 培养 48 h。按照结晶紫染色法测定各组生物膜形成能力,并通过光学显微镜观察各组生物膜形成状况。

### 1.3.11 数据分析

显著性分析采用  $t$  检验进行分析,其中“\*”代表  $P<0.05$ ,“\*\*”代表  $P<0.01$ ,“\*\*\*”代表  $P<0.001$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的筛选及其胞外蛋白酶活力

从黄河鲤不同组织中共筛选到 26 株不同菌落形态的细菌菌株,以胞外蛋白酶作为指标,研究这些菌株分泌毒力因子能力的差异。结果表明:在培养 48 h 后,所筛选菌株中有 6 株细菌(Z2、Z3、Z5、Z8、Z11 和 Z12)在脱脂牛奶平板上产生透明的水解圈(表 1)。其中 Z2、Z3、Z5、Z11 和 Z12 在经过 72 h 的培养后,其水解圈的最大直径均能达到 20 mm 以上。但在这 6 株细菌中,菌株 Z2 相比于其他 5 株细菌,产生水解圈时间最早且所产生的水解圈直径更大,其最大直径达到 32.8 mm。说明菌株 Z2 的胞外蛋白酶活力最强。

### 2.2 菌株的 16S rRNA 基因及系统进化树分析

为了确定这 6 株细菌的进化地位,对其 16S rRNA 基因进行测序分析,通过与 NCBI 的 GenBank 数据库以及 EzTaxon 数据库进行比对,结果表明菌株 Z2 和 Z12 与气单胞菌属(*Aeromonas*)相似性最高,菌株 Z3 和 Z8 与希瓦氏菌属(*Shewanella*)相似性最高,菌株 Z5 与热死环丝菌属(*Brochothrix*)相似性最高,菌株 Z11 与哈夫尼亚菌属(*Hafnia*)相似性最高(表 2)。通过 ClustalX 和 MEGA 4.0 生物软件,基于 16S rRNA 基因序列并采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,由图 1 可知,待测菌株均与其相似性最高的菌株在同一分支,表明待测菌株的进化地位明确。特别是菌株 Z11 所在的哈

表 1 细菌在脱脂牛奶平板上培养不同时间后的水解圈直径

Table 1 Hydrolysis circle diameter of bacterial strains after cultured on skim milk plate for different times (mm)

Strains	24 h	48 h	72 h
LB	0	0	0
Z2	13.7 $\pm$ 1.8	22.9 $\pm$ 3.5	29.6 $\pm$ 2.8
Z3	0	18.1 $\pm$ 2.3	26.3 $\pm$ 0.7
Z5	0	13.5 $\pm$ 3.1	20.2 $\pm$ 2.9
Z8	0	13.9 $\pm$ 0.8	18.8 $\pm$ 0.9
Z11	0	14.8 $\pm$ 2.1	22.5 $\pm$ 2.6
Z12	0	17.2 $\pm$ 2.3	20.9 $\pm$ 5.6

表 2 检测菌株与部分报道菌株的相似性比较  
Table 2 Similarity comparison between the isolated strains and part of reported strains

Bacterial strains	Top-hit species	Similarity (%)
Z2	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i> ATCC 33658	99.86
Z3	<i>Shewanella putrefaciens</i> JCM 20190	98.93
Z5	<i>Brochothrix thermosphacta</i> DSM 20171	99.79
Z8	<i>Shewanella xiamenensis</i> S4	98.93
Z11	<i>Hafnia paralvei</i> ATCC 29927	99.50
Z12	<i>Aeromonas veronii</i> CECT 4257	99.64

夫尼亚菌属和 Z2、Z12 所在的气单胞菌属均属于鱼类病原菌，常引发鱼类疾病和死亡。

2.3 偶氮酪蛋白法测定胞外蛋白酶活力

采用偶氮酪蛋白法对 6 株细菌的胞外蛋白酶活

力进行进一步检测，结果如图 2 所示。在培养 24 h 后，菌株 Z2 的胞外蛋白酶活力最高，显著高于其他 5 株细菌，这也与脱脂牛奶平板法测定的结果一致，菌株 Z2 在短时间内可表现出较高的胞外蛋白酶活力且在整个培养过程中均保持较高水平。随着培养时间的增加，菌株 Z5、Z8、Z11 和 Z12 的胞外蛋白酶活力均呈现递增的趋势，其中菌株 Z11 和 Z12 在培养 72 h 后的胞外蛋白酶活力明显增高，与菌株 Z2 没有明显的差别( $P>0.05$ )。菌株 Z3 和 Z8 的胞外蛋白酶活力在整个培养过程中均处于较低水平，明显低于其他 4 株细菌( $P<0.05$ )。由此可知，菌株 Z2 的胞外蛋白酶活力最强，菌株 Z11 和 Z12 分泌胞外蛋白酶的能力有滞后现象，其在培养后期胞外蛋白酶活力增强。

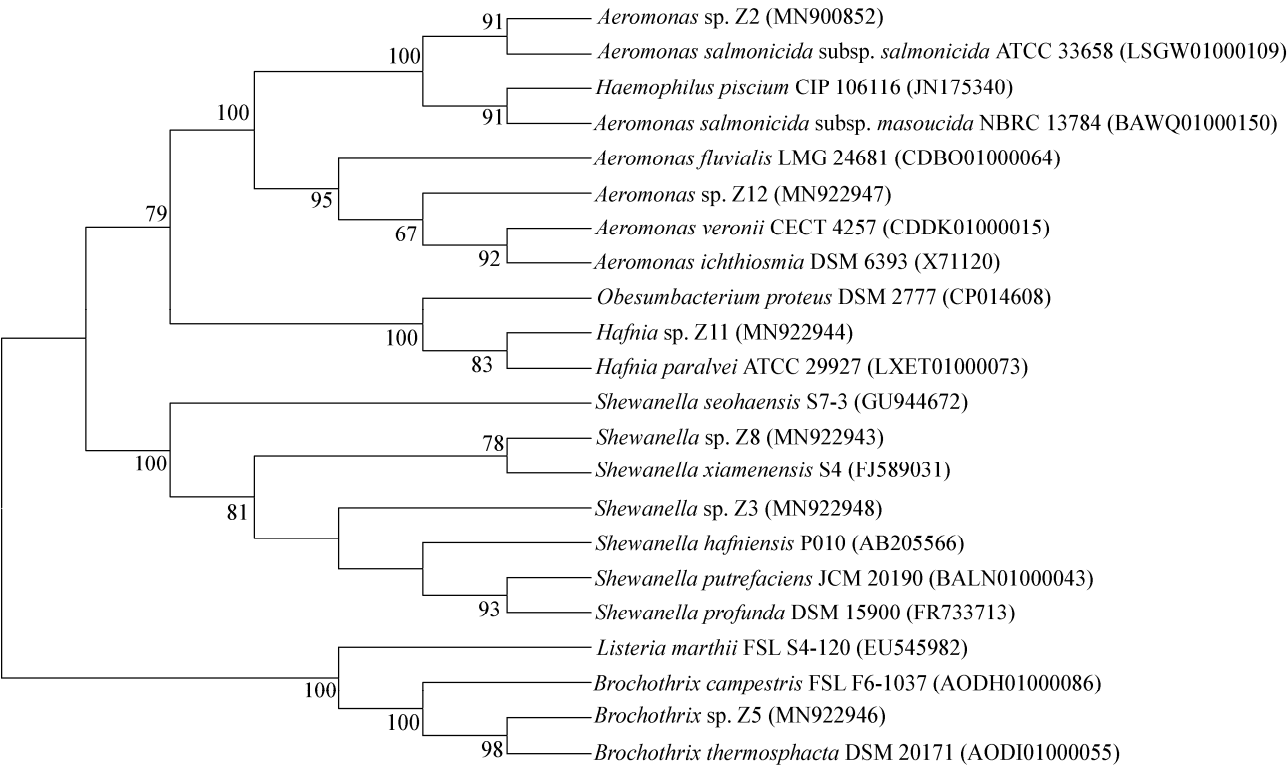


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的分离菌株与部分报道菌株的系统进化树

Figure 1 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic positions of the isolated bacterial strains based on 16S rRNA gene sequence

注：步长值通过 1 000 次重复运算在各分支点显示出来；只保留步长值大于 60%

Note: Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) are shown at branch points; Only bootstrap values >60% are showed

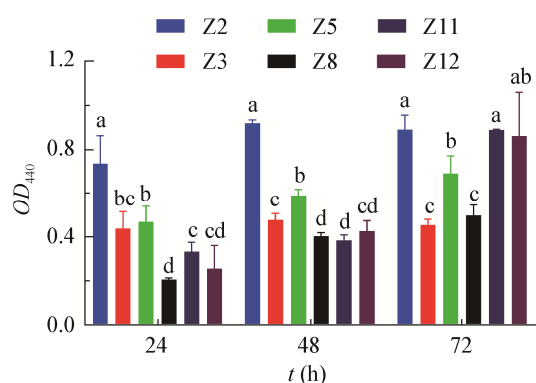


图2 菌株胞外蛋白酶活力的检测(偶氮酪蛋白法)

Figure 2 Detection of extracellular protease activity with method of azo casein method

注: 不同的小写字母表示处理之间在统计学上差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同

Note: The different lowercases represent statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). The same below

## 2.4 生物膜形成能力的测定

利用结晶紫染色法对6株细菌的生物膜形成能力进行定量测定, 其中空白对照组平均  $OD_{595}$  值加上其3倍标准差(SD)作为细菌生物膜形成的临界值( $OD_C$ ), 若待测菌株的  $OD_{595} \leq OD_C$  则为无生物膜形成能力,  $OD_C < OD_{595} \leq 2OD_C$  则为生物膜形成能力较弱,  $2OD_C < OD_{595} \leq 4OD_C$  则为生物膜形成能力中等,  $OD_{595} > 4OD_C$  则为生物膜形成能力强。菌株Z3、Z5和Z11的平均  $OD_{595}$  值分别为  $1.72 \pm 0.30$ 、 $1.01 \pm 0.26$  和  $0.76 \pm 0.10$ , 均显著大于  $4OD_C$  ( $0.16 \pm 0.013$ ), 表明这3株细菌的生物膜形成能力均很强。菌株Z12的平均  $OD_{595}$  值为  $0.60 \pm 0.05$ , 大于  $2OD_C$  且小于  $4OD_C$ , 表明该菌的成膜能力一般。然而菌株Z2和Z8的平均  $OD_{595}$  值分别为  $0.21 \pm 0.02$  和  $0.17 \pm 0.01$ , 均小于  $2OD_C$ , 说明这2株菌的成膜能力较弱(图3)。结合胞外蛋白酶的水平可知, 菌株Z11和Z12不仅产胞外蛋白酶能力较强, 而且具有较高的成膜能力, 说明这2株细菌产毒力因子能力较强, 值得进一步研究。

## 2.5 AI-2的测定

采用哈维氏弧菌BB170检测6株菌的群体感应信号分子AI-2活性。如图4所示, 由6株细菌制备

的无菌上清液均可诱导哈维氏弧菌BB170发光, 其中菌株Z11诱导的发光值在这6株菌中最高, 显著高于其他5株细菌( $P < 0.05$ )。但是与阳性对照(BB170 无菌上清)相比, 6株菌株所诱导的发光值较低, 显著低于阳性对照组( $P < 0.01$ )。因此, 6株菌虽能分泌群体感应信号分子AI-2, 但6株细菌产AI-2整体水平不高。

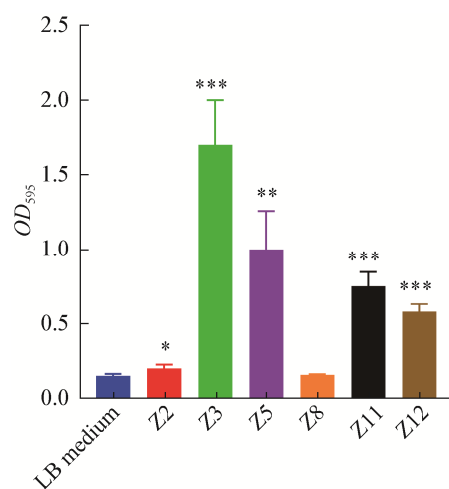


图3 生物膜形成能力的测定

Figure 3 Determination of biofilm forming ability

注: 与对照相比, \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ 。下同

Note: Compared to the control, \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ . The same below

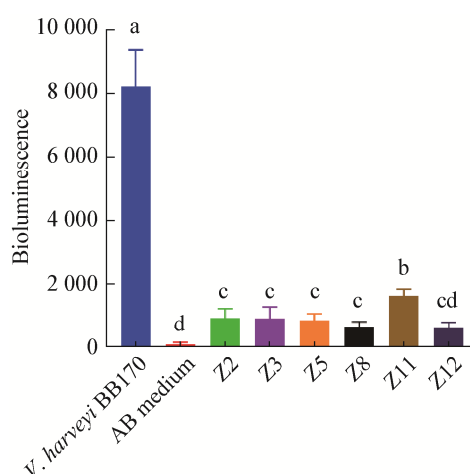


图4 AI-2的测定

Figure 4 Determination of AI-2

## 2.6 菌株产 AHLs 能力测定

采用报告菌株紫色杆菌 CV026 检测 6 株菌分泌 AHLs 信号分子的能力, 紫色杆菌 CV026 是 *cvil:mini-Tn5* 突变体, 其自身不呈现紫色, 当外源 AHLs 信号分子存在时, AHLs 分子则可以与含有相应靶启动子的基因序列结合, 促使紫色素分泌而使菌体呈现紫色。如图 5 所示, 经 48 h 培养后, 以报告菌株自身作为阴性对照, 在 6 株菌中只有菌株 Z11 和 Z12 在培养过程中能分泌 AHLs 信号分子, 诱导紫色杆菌 CV026 产生紫色素, 呈现紫色, 而其他 4 株细菌无明显现象, 说明菌株 Z11 和 Z12 具有产生 AHLs 信号分子的能力。

## 2.7 细菌生长曲线及 AHLs 产生规律

菌株 Z11 和 Z12 分别接种于 LB 液体培养基

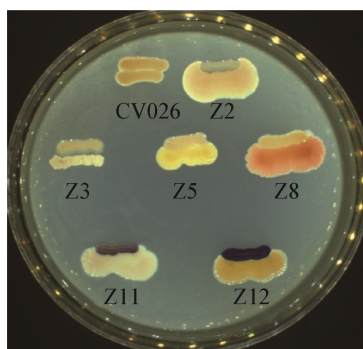


图 5 报告平板平行划线法检测 AHLs 信号分子  
Figure 5 Determination of AHLs parallel marking method

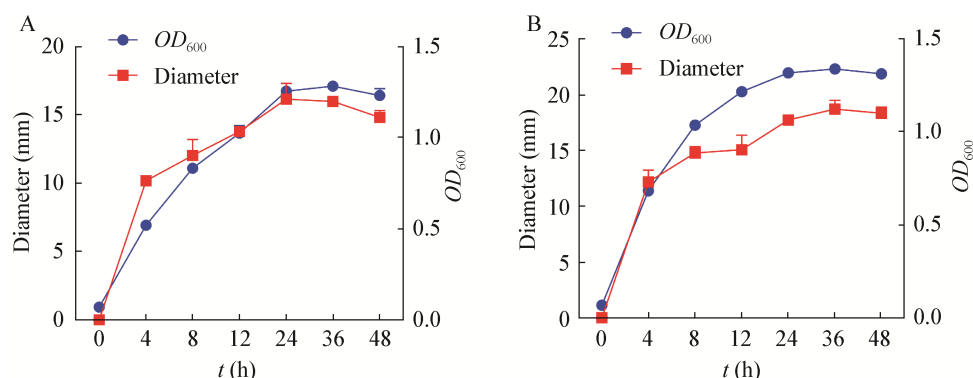


图 6 菌株 Z11 (A) 和 Z12 (B) 的生长曲线和 AHLs 产生规律  
Figure 6 Growth curve and AHLs production of strains Z11 (A) and Z12 (B)

中, 对其生长曲线和 AHLs 分泌动态进行检测。如图 6 所示, 2 株细菌的延滞期很短, 生长繁殖迅速, 在培养 4 h 内 2 株细菌均进入对数生长阶段。随着培养时间增加, 菌株 Z11 和 Z12 在 24 h 进入稳定期, 生长趋于稳定, 其细菌密度 ( $OD_{600}$ ) 分别达到  $1.25 \pm 0.02$  和  $1.32 \pm 0.02$ 。2 株细菌分泌 AHLs 动态由紫色圈直径的大小进行表征, 紫色圈直径越大表明 AHLs 累积活性越大。在培养 4 h 后, 菌株 Z11 和 Z12 便有可检测的 AHLs 产生, 而且随着细菌密度的增加 AHLs 累积量增大。菌株 Z11 和 Z12 的 AHLs 分泌量在培养 24 h 和 36 h 达到最高水平, 其紫色圈直径分别达到  $16.1 \pm 1.15$  mm 和  $18.7 \pm 0.80$  mm, 随后趋于稳定。结果表明, 菌株 AHLs 的分泌动态与其细菌密度有密切关系, 随着细菌密度的增加而分泌量升高。

## 2.8 AHLs 对胞外蛋白酶的影响

为了探究信号分子 AHLs 与菌株胞外蛋白酶活力的关联, 通过外源添加不同浓度的 C4-HSL、C6-HSL 和 C8-HSL, 探究外源 AHLs 对菌株胞外蛋白酶活力的影响。如图 7 所示, 高浓度 C4-HSL 的添加显著 ( $P < 0.01$ ) 提高了菌株 Z11 的胞外蛋白酶活力 (图 7A), 而低浓度的 C4-HSL 对菌株 Z11 胞外蛋白酶活力没有影响, C6-HSL 和 C8-HSL 的添加同样对菌株 Z11 胞外蛋白酶活力没有作用。图 7B 表明外源添加 HSL 对菌株 Z12 胞外蛋白酶的影响,



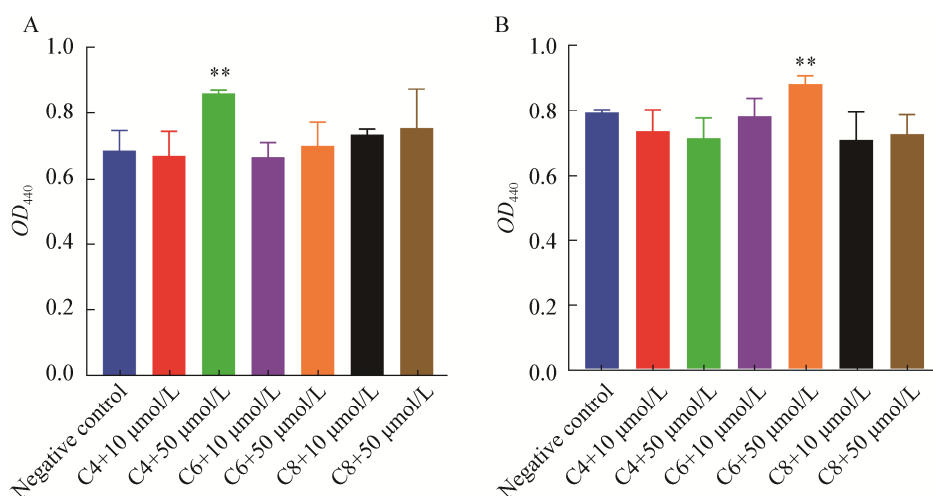


图 7 外源添加不同浓度 HSLs 对菌株 Z11 (A)和 Z12 (B)胞外蛋白酶活力的影响

Figure 7 Effects of exogenous HSL with different concentrations on extracellular protease activities of Z11 (A) and Z12 (B)

由结果可知,高浓度 C6-HSL 对菌株 Z11 的胞外蛋白酶活力有明显( $P<0.01$ )的促进作用。结果表明外源添加 HSL 对菌株胞外蛋白酶活力有一定的促进作用,群体感应信号分子 AHLs 的分泌与菌株的胞外蛋白酶活力有密切关系。

## 2.9 AHLs 对生物膜的影响

为了探究 AHLs 对菌株生物膜形成的影响,通过外源添加不同浓度的 C4-HSL、C6-HSL 和 C8-HSL,测定它们对菌株生物膜形成的影响。如

图 8A 所示,外源添加 C4-HSL 对菌株 Z11 的生物膜形成有促进效果,10  $\mu\text{mol/L}$  C4-HSL 在一定程度上( $P<0.05$ )提高菌株 Z11 的生物膜形成,50  $\mu\text{mol/L}$  C4-HSL 能够显著促进菌株 Z11 的生物膜形成,而 C6-HSL 和 C8-HSL 对菌株 Z11 的生物膜形成能力没有影响。在菌株 Z12 中(图 8B),高浓度 C6-HSL 对生物膜的形成有促进效果( $P<0.05$ ),而低浓度 C8-HSL 的添加反而抑制了菌株生物膜的形成( $P<0.05$ )。结果表明,外源添加 HSL 对于菌株生

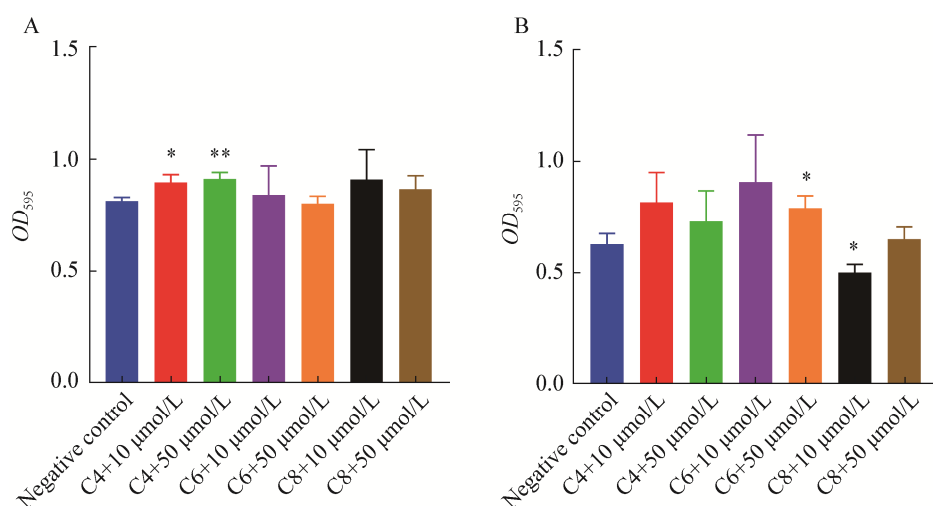


图 8 外源添加不同浓度 HSL 对菌株 Z11 (A)和 Z12 (B)生物膜的影响

Figure 8 Effects of exogenous HSL with different concentrations on biofilm of Z11 (A) and Z12 (B)



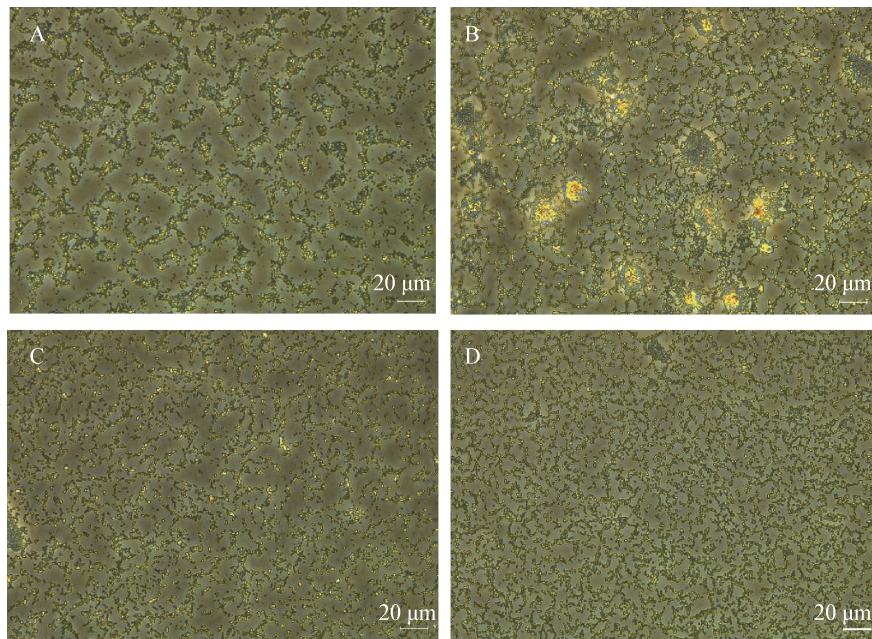


图9 正常生长及 HSL 作用下的菌株 Z11 (A、B)和 Z12 (C、D)的生物膜形成状态

Figure 9 Biofilm formation of strain Z11 (A, B) and Z12 (C, D) with and without addition of HSL

物膜的形成有明显的影响。通过光学显微镜观察菌株 Z11 和 Z12 在分别添加 50  $\mu\text{mol/L}$  C4-HSL 和 C6-HSL 条件下的生物膜形成水平,结果如图 9 所示。正常生长的菌株 Z11 细胞聚集成团,菌落相互融合,形成成熟网状的生物膜(图 9A);在添加 HSL 后,菌株 Z11 形成的生物膜更加致密(图 9B);正常生长的菌株 Z12 与添加 HSL 的菌株 Z12 所形成的生物膜均比较明显(图 9C),但是添加 HSL 菌株形成的生物膜与正常生长菌株相比更加均匀、紧密(图 9D)。结果表明,外源 HSL 的添加对于菌株 Z11 和 Z12 生物膜的形成有一定促进作用。

### 3 讨论

黄河鲤的常见病害主要有细菌性和寄生虫性两大类,由于细菌繁殖速度快、致病性强,细菌病害已经成为影响黄河鲤养殖的主要病害。细菌的致病能力与其毒力因子的产生密切相关<sup>[13]</sup>,而毒力因子的表达往往受到群体感应的调控。本文通过开展群体感应信号分子与毒力因子特性的相关性研究,以为黄河鲤细菌性病害的防治提供

理论参考。

本研究从黄河鲤组织中筛选到多株细菌,通过对其毒力因子包括胞外蛋白酶和生物膜形成的测定,最终确定 6 株细菌具有较强的胞外蛋白酶活力和生物膜形成能力,表明其产毒力因子水平较高。通过 16S rRNA 基因测序分析,发现这 6 株细菌分别属于希瓦氏菌属、热死环丝菌属、哈夫尼亚菌属和气单胞菌属,均被报道有腐败鱼、虾,导致水产疾病的作用<sup>[2]</sup>。细菌的致病性与其毒力因子的合成密切相关,胞外蛋白酶和生物膜是细菌主要的毒力因子,其中胞外蛋白酶不仅能为细菌生长提供必要的营养,还直接破坏宿主免疫防御系统,而生物膜的形成有利于细菌抵抗外界不利条件,维持其生长繁殖<sup>[13]</sup>。通过对筛选菌株的胞外蛋白酶活力和生物膜形成能力的检测,发现菌株 Z11 和 Z12 与其他 4 株细菌相比,不仅具有较强的蛋白酶活力,还能形成致密的生物膜,其产毒能力更强。菌株 Z11 属于哈夫尼亚菌属,该属细菌是常见的细菌性食品污染菌,通过产生毒力因子引起多种疾病感染<sup>[14]</sup>。李英等从海产品中筛选到

一株蜂房哈夫尼亚菌 H4, 具有较高的胞外蛋白酶活力<sup>[15]</sup>。马艳等对大菱鲆源蜂房哈夫尼亚菌 Ha-01 生物膜形成能力进行测定, 发现生物被膜产生量与培养时间呈正相关, 在 72 h 达到最大值( $OD_{595}$  达到 0.15 左右), 然后逐渐趋于稳定<sup>[16]</sup>。与菌株 Ha-01 相比, 菌株 Z11 的生物膜产量最大可达到 0.8 左右, 表明菌株 Z11 具有更高的生物膜形成能力。菌株 Z12 属于气单胞菌属, 该属细菌是引起水产养殖病害的最常见致病菌之一, 广泛分布于自然界的各种水体, 可大规模引起淡水鱼类皮肤溃疡和急性出血性败血症, 是典型的水产生物病原菌<sup>[17]</sup>。崔一等对嗜水气单胞菌 ATCC 7966 的胞外蛋白酶活力和生物膜形成能力进行测定, 结果发现在菌株 48 h 培养上清液中胞外蛋白酶活力为  $91.2 \pm 3.9$  U, 经过 36 h 培养后菌株的生物膜产量达到 3.0 左右<sup>[18]</sup>。与菌株 ATCC 7966 相比, 菌株 Z12 的生物膜形成能力( $OD_{595}$  达到 0.6 左右)较弱, 但是其胞外蛋白酶活力显著高于菌株 ATCC 7966。

近年来大量研究证实, 食源性细菌和水产病原菌的毒力因子特性均受到群体感应系统的调控, 许多生理特征受到群体感应信号分子的影响<sup>[19]</sup>。Kozlova 等发现嗜水气单胞菌 SSU 中存在 LuxS 依赖型的 AI-2 群体感应系统, 并且对该菌的致病性有一定作用, *luxS* 基因突变株与野生型菌株相比运动性下降, 但是生物膜合成能力和毒性反而增强<sup>[20]</sup>。本研究中, 同属于气单胞菌属的菌株 Z2 和 Z12 产 AI-2 能力很低, 因此可能存在其他类型的群体感应系统。通过报告平板划线法检测发现, 菌株 Z11 和 Z12 均可引起紫色杆菌 CV026 合成紫色素, 而使菌体呈现紫色, 表明这 2 株细菌具有分泌 AHLs 信号分子的能力。马艳等利用紫色杆菌 CV026 和根癌农杆菌 A136 进行平行划线检测蜂房哈夫尼亚菌 Ha-01, 发现该菌能引起报告菌株变色, 能够分泌 AHLs<sup>[16]</sup>。菌株 Z2 和 Z12 均属于气单胞菌, 但是菌株 Z12 能够引起报告菌株变色, 而菌株 Z2 不能。有研究证实, 气单胞菌中存在 AHL

系统缺失型菌株, 其不能分泌 AHLs; Dos Reis Ponce-Rossi 等通过研究不含有 AHL 型 QS 系统的嗜水气单胞菌 ATCC 7966, 发现其产蛋白酶活性、生物膜形成能力和产毒力因子能力与其他含有 AHL 型 QS 系统的嗜水气单胞菌无差别, 说明在菌株 ATCC 7966 中存在不依赖 *ahyIR* 型的调控系统调控其生理活性<sup>[21]</sup>。因此, 菌株 Z2 可能属于 AHL 系统缺失型菌株。

研究发现群体感应信号分子对于细菌毒力因子特性有一定的影响, 通过外源添加信号分子 HSLs 研究信号分子对菌株胞外蛋白酶活力和生物膜合成能力的影响<sup>[22]</sup>。本研究发现高浓度的 C4-HSL 对菌株 Z11 的胞外蛋白酶活力和生物膜合成能力均有较好的促进效果。这与 Hou 等的研究不同, 他们发现低浓度(5、10  $\mu\text{mol/L}$ )的 C6-HSL 促进蜂房哈夫尼亚菌生物膜形成, 而高浓度的(20、40  $\mu\text{mol/L}$ )的 C6-HSL 对菌株生物膜形成有抑制作用<sup>[23]</sup>。Zhu 等构建蜂房哈夫尼亚菌 H4 的 AHLs 合成基因缺失突变株  $\Delta\text{luxI}$ , 其生物膜形成能力下降, 而外源添加 C4-HSL 能够提高其生物膜形成能力<sup>[24]</sup>, 表明 C4-HSL 可能作为重要的信号分子参与其生物膜的形成。菌株 Z12 的胞外蛋白酶活力和生物膜形成能力受到 C6-HSL 影响较大, 高浓度 C6-HSL 对其活力有促进作用。张彩丽等同样发现高浓度 C6-HSL 对气单胞菌 W41 的生物膜形成有促进作用, 低浓度 C6-HSL 无效果, 但是低浓度的 AHLs 促进气单胞菌 W69 生物膜的形成, 高浓度的 AHLs 抑制 W69 生物膜的形成<sup>[25]</sup>。Valderrama 等构建嗜水气单胞菌的 C4-HSL 合成基因 *ahyI* 的缺失突变株, 发现突变株不能形成成熟的生物膜, 表明 C4-HSL 参与其生物膜的合成<sup>[26]</sup>。C4-HSL 和 C6-HSL 分别对菌株 Z11 和 Z12 的毒力因子特性有重要促进作用, 表明 C4-HSL 和 C6-HSL 可能分别作为重要的信号分子参与菌株 Z11 和 Z12 毒力因子的产生。因此, 菌株 Z11 和 Z12 的 AHLs 信号分子类型及其相关合成基因的确定工作需要进一步研究。

## 4 结论

本研究从黄河鲤组织中筛选到 2 株胞外蛋白酶活力较高且生物膜形成能力较强的菌株 *Hafnia* sp. Z11 和 *Aeromonas* sp. Z12, 对其分泌的群体感应信号分子进行检测, 结果发现 2 个菌株产 AI-2 能力较低, 但能够分泌较高水平的 AHLs 信号分子, 而且 AHLs 活性具有菌体密度依赖性。AHLs 对菌株胞外蛋白酶活力和生物膜形成能力影响不同, 高浓度 C4-HSL 和 C6-HSL 能够分别提高 *Hafnia* sp. Z11 和 *Aeromonas* sp. Z12 的胞外蛋白酶活力和生物膜形成能力。本研究对水产细菌的毒力因子特性和群体感应信号分子进行了探究, 并证实了信号分子对毒力因子特性的影响, 为水产病原菌的防治提供了一定的理论支持。

## REFERENCES

- [1] Feng G, Xu SS, Wang C, Yan LE, Zhang X, Li J. Actinobacterial diversity in a coastal wetland of the Yellow River Delta revealed by culture-independent approach[J]. Microbiology China, 2013, 40(9): 1570-1579 (in Chinese)  
冯鸽, 许姗姗, 王超, 严立恩, 张璇, 李静. 黄河三角洲滨海湿地非培养放线菌多样性[J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1570-1579
- [2] Wu YY, Li FX, Li LH. Research progress of pathogenic microorganisms and their technologies of detection and control in aquatic products[J]. Microbiology China, 2009, 36(1): 113-119 (in Chinese)  
吴燕燕, 李凤霞, 李来好. 水产品病原菌及其检测与控制技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1): 113-119
- [3] Fu YY, Cai QL, Wang YQ, Li WX, Yu J, Yang GD, Lin WX, Lin XM. Four LysR-type transcriptional regulator family proteins (LTTRs) involved in antibiotic resistance in *Aeromonas hydrophila*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2019, 35(8): 127
- [4] Sun F, Yan HC, Wang MZ. Advance of the diversity of bacterial quorum sensing and quorum quenching[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(3): 454-467 (in Chinese)  
孙锋, 严慧聪, 汪美贞. 细菌群体感应调控多样性及群体感应淬灭[J]. 微生物学报, 2019, 59(3): 454-467
- [5] Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing[J]. Annual Review of Genetics, 2001, 35: 439-468
- [6] Sturme MHJ, Kleerebezem M, Nakayama J, Akkermans ADL, Vaughan EE, De Vos WM. Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 81(1/4): 233-243
- [7] Zhao J, Quan CS, Jin LM, Chen M. Production, detection and application perspectives of quorum sensing autoinducer-2 in bacteria[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 268: 53-60
- [8] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599
- [9] Bendicho S, Martí G, Hernández T, Martín O. Determination of proteolytic activity in different milk systems[J]. Food Chemistry, 2002, 79(2): 245-249
- [10] Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 40(2): 175-179
- [11] DeKeersmaecker SCJ, Vanderleyden J. Constraints on detection of autoinducer-2 (AI-2) signalling molecules using *Vibrio harveyi* as a reporter[J]. Microbiology, 2003, 149(Pt8): 1953-1956
- [12] Ravn L, Christensen AB, Molin S, Givskov M, Gram L. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics[J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 44(3): 239-251
- [13] Calanche JB, Beltrán JA, Arias AJH. Aquaculture and sensometrics: the need to evaluate sensory attributes and the consumers' preferences[J]. Reviews in Aquaculture, 2020, 12(2): 805-821
- [14] Li X, Zhang GL, Zhu YL, Bi JR, Hao HS, Hou HM. Effect of the *luxI/R* gene on AHL-signaling molecules and QS regulatory mechanism in *Hafnia alvei* H4[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 197
- [15] Li Y, Zhang GL, Bi JR, Hou HM. Characterization of extracellular protease from *Hafnia alvei*[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2020, 39(3): 179-183 (in Chinese)  
李英, 张公亮, 毕景然, 侯红漫. 蜂房哈夫尼菌胞外蛋白酶的特性[J]. 大连工业大学学报, 2020, 39(3): 179-183
- [16] Ma Y, Li TT, Cui FC, Yang B, Liu MS, Li JR. Study of quorum sensing and biofilm formation of *Hafnia alvei* separated from Turbot[J]. Modern Food Science & Technology, 2016, 32(8): 70-76 (in Chinese)  
马艳, 李婷婷, 崔方超, 杨兵, 刘明爽, 励建荣. 大菱鲆源蜂房哈夫尼亚菌群体感应现象及生物被膜调控的研究[J]. 现代食品科技, 2016, 32(8): 70-76
- [17] Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2010, 23(1): 35-73

- [18] Cui Y, Zhao J, Zhang FR, Guo WP, Chen M, Quan CS, Fan SD. Construction of *luxS* gene deletion mutant strain in *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2016, 32(5): 462-468 (in Chinese)  
崔一, 赵晶, 张福蓉, 郭婉萍, 陈明, 权春善, 范圣第. 嗜水气单胞菌 ATCC 7966 *luxS* 基因缺失株构建及特性研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(5): 462-468
- [19] Abisado RG, Benomar S, Klaus JR, Dandekar AA, Chandler JR. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions[J]. mBio, 2018, 9(3): e02331-17
- [20] Kozlova EV, Khajanchi BK, Popov VL, Wen JL, Chopra AK. Impact of QseBC system in c-di-GMP-dependent quorum sensing regulatory network in a clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*[J]. Microbial Pathogenesis, 2012, 53(3/4): 115-124
- [21] Dos Reis Ponce-Rossi A, Pinto UM, De Oliveira Barros Ribon A, Bazzolli DMS, Vanetti MCD. Quorum sensing regulated phenotypes in *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 deficient in AHL production[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(3): 1117-1126
- [22] Jahid IK, Lee NY, Kim A, Ha SD. Influence of glucose concentrations on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Food Protection, 2013, 76(2): 239-247
- [23] Hou HM, Zhu YL, Wang JY, Jiang F, Qu WY, Zhang GL, Hao HS. Characteristics of N-Acylhomoserine lactones produced by *Hafnia alvei* H4 isolated from spoiled instant sea cucumber[J]. Sensors, 2017, 17(4): 772
- [24] Zhu YL, Hou HM, Zhang GL, Wang YF, Hao HS. AHLs regulate biofilm formation and swimming motility of *Hafnia alvei* H4[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1330
- [25] Zhang CL, Wang CC, Zhu FF, Liu HM, Liu YL. Detection of quorum sensing in *Aeromonas* spp. isolated from refrigerated grass carp and its regulatory effect on biofilm formation[J]. Food Science, 2019, 40(22): 155-160 (in Chinese)  
张彩丽, 王辰晨, 朱菲菲, 刘海梅, 刘岩龙. 冷藏草鱼源气单胞菌的群体感应现象及其对生物膜形成的影响[J]. 食品科学, 2019, 40(22): 155-160
- [26] Valderrama K, Soto-Davila M, Santander J. Draft genome sequence of the type strain *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658[J]. Genome Announcements, 2017, 5(40): e01064-17