

# 凡纳滨对虾优势腐败菌鉴定及其群体感应现象

刘尊英 郭红 朱素芹 曾名湧\*

(中国海洋大学食品科学与工程学院 山东 青岛 266003)

**摘要:** 为了鉴定凡纳滨对虾的优势腐败菌并研究其是否存在以 N-酰基高丝氨酸内酯类化合物 (AHLs) 介导的群体感应系统, 采用 16S rRNA 序列鉴定凡纳滨对虾的优势腐败菌, 并采用紫色杆菌 CV026 对优势腐败菌的 AHLs 活性进行检测。结果发现凡纳滨对虾优势腐败菌菌株 1 (Aci-1) 和菌株 2 (Aci-2) 均为不动杆菌属, 均存在以 AHLs 为信号分子的群体感应系统。添加外源信号分子 AHLs 能促进 Aci-1 菌株生物膜的形成, 且呈浓度依赖性。在一定的贮藏范围内, 凡纳滨对虾腐败菌信号分子 AHLs 浓度与细菌总数、挥发性盐基氮含量存在正相关性, 其相关系数  $r$  分别为 0.846 6 和 0.986 7, 分别在  $P < 0.05$  与  $P < 0.01$  水平上显著。结论是凡纳滨对虾优势腐败菌不动杆菌菌株存在以 AHLs 介导的群体感应系统, 且与凡纳滨对虾的腐败密切相关。

**关键词:** 凡纳滨对虾, 腐败菌, 群体感应, 信号分子

## Identification and quorum sensing of dominant spoilage bacteria from *Litopenaeus vannamei*

LIU Zun-Ying GUO Hong ZHU Su-Qin ZENG Ming-Yong\*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

**Abstract:** This study was to investigate the dominant spoilage bacteria (DSB) of shrimp and detect the quorum sensing mediated by N-acyl-homoserine lactones (AHLs). The strains of DSB were identified by 16S rRNA gene sequence. AHLs of DSB were detected with strain *Chromobacterium violaceum* CV026. The results indicated that two strains Aci-1 and Aci-2 belong to *Acinetobacter* spp.. Both bacterial strains can secrete AHLs, and the biofilm formation of Aci-1 were significantly affected by exogenous AHLs. There is a positive relationship between the AHLs activity of DSB and the total plate count and TVB-N content of shrimp, and the correlation coefficient is 0.846 6 ( $P < 0.05$ ) and 0.986 7 ( $P < 0.01$ ), respectively. The DSB of shrimp have the quorum sensing system mediated by AHLs, which plays an important role in the spoilage of shrimp.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, Spoilage bacteria, Quorum sensing, Signal molecule.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31071613); 山东省科技攻关项目(No. 2009GG10005011)

\*通讯作者: Tel: 86-532-66782783; ✉: mingyz@ouc.edu.cn

收稿日期: 2011-06-15; 接受日期: 2011-08-16

群体感应(Quorum sensing, QS)是细菌根据自身细胞密度变化进行自我协调的一种群体行为。许多细菌能产生并释放一种被称为自诱导物的信号分子,随着细菌密度的增加,信号分子不断积累,当积累到一定浓度时则会与胞浆受体蛋白结合,调控细菌相关基因的表达,使细菌形成一种群体行为来有效地抵御环境压力、攻击宿主等<sup>[1]</sup>。目前只有少数细菌的群体感应调控特征被发现,研究较为详细的包括铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*<sup>[2]</sup> 毒性基因的表达、致黄假单胞菌 *P. aureofaciens* 抗生素的产生调控<sup>[3]</sup>、大肠杆菌 *Escherichia coli* O157:H7 群集运动<sup>[4]</sup>以及粘质沙雷菌 *S. marcescens* 的色素产生<sup>[5]</sup>等。近年的研究表明,水产品的腐败变质与腐败菌的群体感应现象密切相关,因此,研究凡纳滨对虾优势腐败菌的群体感应现象对对虾的防腐保鲜具有重要的意义。

本实验采用高效检测菌株 *Chromobacterium violaceum* CV026 检测凡纳滨对虾优势腐败菌 AHLs 的产生情况,探讨对虾优势腐败菌群体感应系统与其腐败之间的关系,为对虾的品质劣变寻求有效的控制手段,同时也为细菌群体感应系统的研究积累基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

养殖凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 购自青岛市南山水产市场,平均重量为  $14.82 \pm 0.32$  g,平均体长为  $14.05 \text{ cm} \pm 0.59 \text{ cm}$ 。活虾加氧保活 1 h 内运输至实验室,用自来水冲洗干净,加冰猝死装入无菌样品袋,于  $-0.8 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  温度条件下贮藏。每个处理 2 kg, 3 次重复。

### 1.2 主要试剂及仪器设备

供试菌株紫色杆菌(*C. violaceum* CV026)由美国德克萨斯州立大学 McLean J. C. 教授惠赠,本身不产生酰基高丝氨酸内酯类(AHLs)信号分子,也不产生紫色菌素,当外源 AHLs 存在时,可产生紫色菌素,对 C<sub>4</sub> 到 C<sub>8</sub> 的 AHLs 不同程度敏感<sup>[6]</sup>。对虾优势腐败菌 *Acinetobacter* spp. Aci-1、Aci-2 为本实验室

从腐败的凡纳滨对虾中分离得到;群体感应信号分子 N-乙酰化高丝氨酸内酯(C6-HSL, AHLs 类似物)、二甲基亚砜(DMSO)为 Sigma 公司产品,其它试剂均为化学纯。

主要设备:超净工作台(苏净集团安泰公司)、HPS-250 生化培养箱(哈尔滨市东明医疗仪器厂)、LDZX-40 II 型立式自动电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械)、电动匀浆机(国华科技有限公司)、DHG-9070A 电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏仪器公司)、pH 计:PHS-2C 型(上海大普仪器有限公司)低温恒温培养箱 SHP-2500 (上海精宏仪器公司)、Mutiskan MK3 酶标仪(Thermo 公司)。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 优势腐败菌 16S rRNA 鉴定:**凡纳滨对虾贮藏到货架期终点时(细菌总数  $1.0 \times 10^6$ ),参照郭红等<sup>[7]</sup>的方法进行细菌的分离、纯化。将分离纯化后的优势腐败菌进行 16S rRNA 测序、鉴定。

**1.3.2 对虾腐败菌 AHLs 的提取及活性检测:**对虾腐败菌群体感应信号分子 AHLs 的提取与测定参照文献<sup>[4]</sup>的方法进行。

**1.3.3 对虾腐败菌生物膜形成能力的测定:**将分离得到的优势腐败菌不动杆菌 Aci-1 过夜培养后,按 1:1 000 的比例用新鲜 LB 培养液稀释。取 0.5 mL 分装至新离心管中,加入一定体积的外源信号分子 ( $10 \text{ } \mu\text{mol/L}$  C6-HSL),  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  培养(避免振动) 24 h。然后小心移除菌液,以去离子水轻柔清洗 3 次后,加入 100  $\mu\text{L}$  0.1% (W/V)的结晶紫室温染色 15 min,然后用去离子水冲洗离心管至水清晰。在与液面交界的位置,细菌形成坚固的附着膜,水冲不掉则被结晶紫染色,观察及拍照。同时以空白试管做同样的处理,作为对照。加入 0.5 mL 95%乙醇漂洗被染色的生物膜,将洗液于 570 nm 下测定吸光值,以吸光值的大小反映生物膜的形成能力。

**1.3.4 细菌总数测定:**参照 GB/ T 4789. 2-2008 中的平板计数法测定。

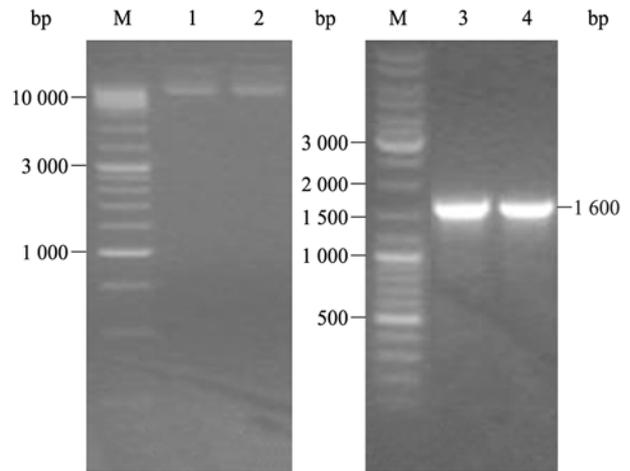
**1.3.5 挥发性盐基氮(TVB-N)测定:**参考 GB/T 5009.44-2003,微量扩散法,每个样品测 3 个平行,取平均值。

**1.3.6 统计分析方法:**本实验数据用 SPSS 软件进

行标准偏差分析和单因素方差分析(One-way ANOVA)。

## 2 研究结果

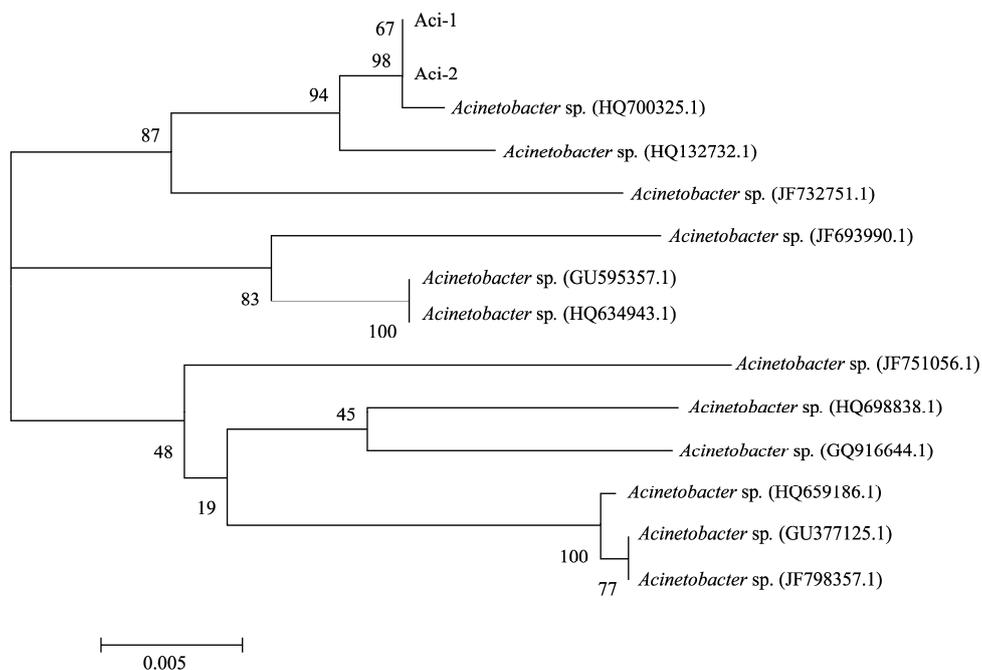
**2.1 凡纳滨对虾优势腐败菌鉴定及系统发育分析**  
将分离得到的优势腐败菌的 16S rRNA 部分序列进行测序(图 1), 序列提交 GenBank 数据库。测序结果先利用 BLAST 软件从 GenBank 与 EMBL 等数据库中调出相关的不动杆菌的 16S rRNA 序列, 用 ClustalX 1.8 软件排序, 随后用 MEGA 4.1 软件按照 Neighbour-Joining 聚类, 构建系统发育树, 如图 2 所示。根据 16S rRNA 序列分析结果, 菌株 Aci-1、Aci-2 均为不动杆菌属(*Acinetobacter* spp.)。



**图 1 Aci-1、Aci-2 的 16S rRNA PCR 扩增产物电泳图**  
**Fig. 1 16S rRNA PCR amplified products electrophoresis of Aci-1 and Aci-2**

注: M: DNA 标准; 1,2: Aci-1、Aci-2 基因组; 3,4: Aci-1、Aci-2 的 16S rRNA PCR 扩增产物。

Note: M: Marker; 1,2: Genomic electrophoresis of Aci-1 and Aci-2; 3,4: 16S rRNA PCR amplified products electrophoresis of Aci-1 and Aci-2.



**图 2 不动杆菌 Aci-1、Aci-2 与其它不动杆菌之间的系统发育关系**

**Fig. 2 The relationship between Aci-1, Aci-2 and other *Acinetobacter* phylogenetic relationship**

注: 0.005 代表 1/200 进化距离单位; 分支上的数值代表为自举 1 000 次的结果; 括号中序号为 GenBank 登录号。

Note: Scale bar: 0.005 nucleotide substitution per 50 nucleotides of 16S rRNA sequence. Nuerals on branches are the supporting percentage by 1 000 replicates. Serial numbers in parentheses are GenBank accession numbers.

## 2.2 Aci-1、Aci-2 的信号分子提取及活性检测

AHLs 活性测定结果表明, 分离得到的对虾优势腐败菌株 Aci-1、Aci-2 产生的信号分子均能诱导紫色杆菌 CV026 产生紫色色素(图 3)。随培养时间延长, Aci-1、Aci-2 的 AHLs 浓度逐渐增大(图 4), 但在整个培养过程中, 相同培养时间内 Aci-1、Aci-2 的 AHLs 浓度并无显著差异( $P>0.05$ )。

## 2.3 外源信号分子对对虾腐败菌 Aci-1 生物膜形成的影响

为进一步验证对虾腐败菌 Aci-1 的群体感应现象, 将  $10 \mu\text{mol/L}$  的外源信号分子 AHLs 添加到 Aci-1 的培养基中, 观察其对 Aci-1 生物膜形成的调控。结果表明, 外源信号分子 AHLs 可促进 Aci-1 的生物膜的形成, 并呈现浓度依赖性(图 5)。

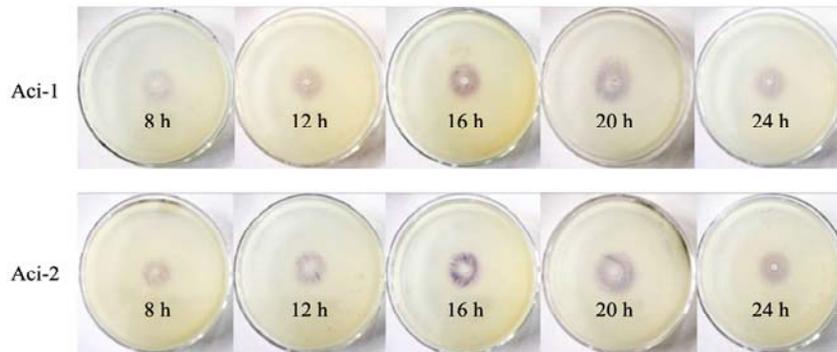


图 3 Aci-1、Aci-1 产生的信号分子诱导紫色杆菌 CV026 产生的紫色环  
Fig. 3 The purple ring of CV026 induced by signal molecules extracted from Aci-1 and Aci-2

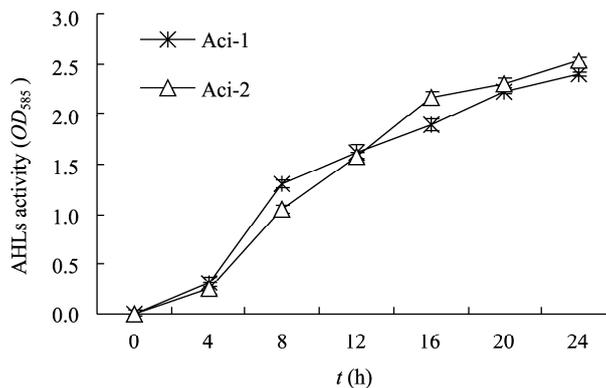


图 4 Aci-1、Aci-1 产生的信号分子诱导的紫色菌素含量变化  
Fig. 4 The changes of AHLs content extracted from Aci-1 and Aci-2

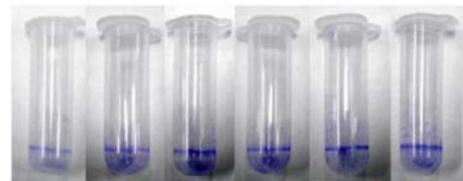
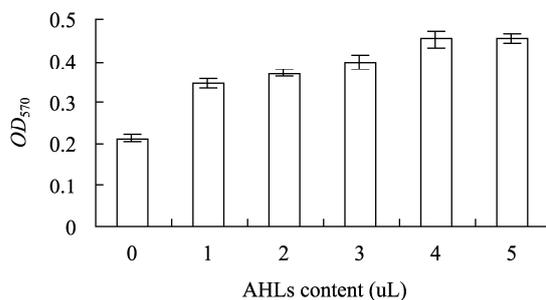


图 5 外源群体感应信号分子 AHLs 对 Aci-1 生物膜形成的影响  
Fig. 5 Effects of exogenous AHLs on the biofilm of Aci-1

## 2.4 对虾贮藏过程中信号分子浓度与腐败指标之间的关系

凡纳滨对虾在冷藏( $-0.8\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ )过程中其细菌总数与挥发性盐基氮含量均呈逐渐增加趋势(图6)。腐败菌信号分子 AHLs 浓度在贮藏 0-4 d 呈逐渐增加趋势, 贮藏 4 d 后, 又逐渐下降(图 6)。将冷藏期间凡纳滨对虾细菌总数、挥发性盐基氮含量与信

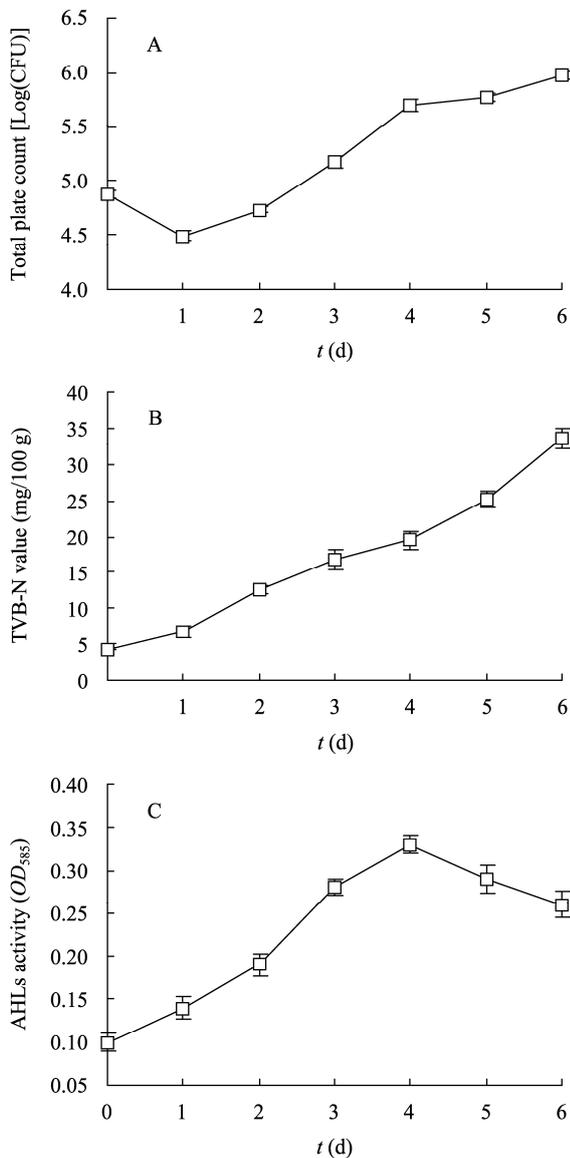


图 6 对虾冷藏过程中 AHLs 活性、细菌总数、TVB-N 变化情况

Fig. 6 The changes of AHLs activity, total plate count and TVB-N of shrimp during cold storage

贮藏的 0-4 d, 细菌总数、挥发性盐基氮含量与信号

子 AHLs 浓度进行相关性分析, 结果表明, 在 AHLs 活性呈显著正相关, 其相关系数分别为  $r$  分别为 0.846 6 ( $P < 0.05$ ) 和 0.986 7 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

相关研究认为凡纳滨对虾的腐败变质多以细菌性腐败为主。赵海鹏等从腐败的凡纳滨对虾分离的优势腐败菌被鉴定为腐败希瓦氏菌属(*Shewanella putrefaciens*)和气单胞菌属(*Aeromonas hydrophila*)细菌<sup>[8]</sup>。徐丽敏等从腐败的对虾中分离的优势腐败菌被鉴定为气单胞菌属(*Aeromonas hydrophila*)和假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)细菌<sup>[9]</sup>。郭红等研究表明冰温条件下凡纳滨对虾的优势腐败菌主要为腐败希瓦氏菌属(*Shewanella putrefaciens*)、黄杆菌属(*Aeromonas hydrophila*)和不动杆菌属(*Aeromonas hydrophila*)<sup>[7]</sup>。本研究结果进一步证实, 在冷藏条件下凡纳滨对虾的腐败以细菌性腐败为主, 分离得到的优势腐败菌均为不动杆菌属(*Aeromonas* spp.)细菌。

目前研究证实, 食品中的腐败菌产生 AHLs 是一个普遍现象, 并且腐败菌的 AHLs 参与食品腐败变质过程的调控<sup>[10]</sup>, 如胡萝卜欧文氏菌(*E. carotovora*)可通过 AHLs 介导的群体感应系统调控果胶酶活性而加速豆芽的腐败变质<sup>[11]</sup>, 肠杆菌科细菌(*Enterobacteriaceae*)参与鱼、肉的腐败变质<sup>[12]</sup>, 假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)通过 AHLs 启动腐败因子的表达引起牛奶变质等<sup>[13]</sup>。本研究结果表明对虾的优势腐败菌株 Aci-1 和 Aci-2 均可产生 AHLs, 且 AHLs 的含量与对虾的腐败变质具有显著的相关性, 表明 AHLs 介导的群体感应系统参与了对虾腐败菌的致腐过程, 但其详细的致腐机理有待进一步研究。本研究结果将为以 AHLs 为靶点的食品防腐保鲜剂的研究提供基础研究数据与技术支持。

致谢: 感谢美国 Texas State University McLean JC 教授提供紫色杆菌 CV026 菌株。

## 参 考 文 献

- [1] Juhas M, Eberl L, Tümmler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*[J]. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(4): 459-471.
- [2] Ganin H, Tang X, Meijler MM. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by AI-2 analogs[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2009, 19(14): 3941-3944.
- [3] de Kievit TR, Iglewski BH. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(9): 4839-4859.
- [4] Vatter DA, Mihalik K, Crixell SH, et al. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors[J]. *Fitoterapia*, 2007, 78(4): 302-310.
- [5] Thomson NR, Crow MA, McGowan SJ, et al. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(3): 539-556.
- [6] Mclean RJC, Pierson LS, Fuqua C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 58(3): 351-360.
- [7] 郭红, 董士远, 刘尊英, 等. 南美白对虾冰温下菌相变化[J]. *中国海洋大学学报: 自然科学版*, 2010, 40(6): 77-80.
- [8] 赵海鹏, 谢晶, 严文蓉. 南美白对虾冷藏过程中的细菌分离、初步鉴定及菌相分析[J]. *江苏农业学报*, 2011, 27(1): 164-168.
- [9] 徐丽敏, 薛长湖, 李兆杰, 等. 水溶性壳聚糖对南美白对虾品质及腐败菌相变化的影响[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(6): 107-110.
- [10] Gram L, Ravn L, Rasch M, et al. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 78(1-2): 79-97.
- [11] Andersson RA, Eriksson ARB, Heikinheimo R, et al. Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of *expR(Ecc)*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(4): 384-393.
- [12] Ravn L, Christensen AB, Molin S, et al. 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] Shobharani P, Agrawal R. Interception of quorum sensing signal molecule by furanone to enhance shelf life of fermented milk[J]. *Food Control*, 2010, 21(1): 61-69.

## 稿件书写规范

### 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。