

一株嗜水气单胞菌的分离鉴定和不同条件对其群体感应 AHLs 活性的影响

李婷婷¹, 杨兵², 励建荣²

(1. 大连民族大学生命科学院, 辽宁大连 116600) (2. 渤海大学食品科学与工程学院, 辽宁省食品安全重点实验室, 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, 辽宁锦州 121013)

摘要: 本研究从腐败的大菱鲜中分离得到一株具有群体感应(Quorum Sensing, QS)的细菌, 通过生理生化试验、16S rRNA 鉴定其为嗜水气单胞菌(Ah-11), 采用报告平板打孔法探究其生长阶段 N-酰基高丝氨酸内酯(AHLs)活性变化以及环境因素对其分泌的 AHLs 活性的影响。结果显示, 菌株 Ah-11 能够诱导报告菌株紫色杆菌 CV026 和根癌农杆菌 A136 产生颜色反应; 菌株 Ah-11 在生长阶段的 AHLs 活性随着培养时间的增加呈现先升高后降低趋势; 不同碳源的液体培养基对 Ah-11 分泌 AHLs 的影响能力由高到低为麦芽糖>葡萄糖>蔗糖>果糖>乳糖>木糖; Ah-11 在弱酸或者强碱条件下 AHLs 活性较低, pH=8.0 时 AHLs 活性最大; 较高浓度的氯化钠不仅会抑制 Ah-11 的生长, 同时也抑制其 AHLs 的分泌, 0.5~1.0 g/100 g 的氯化钠质量浓度可以增强 Ah-11 的 AHLs 活性; 菌株 Ah-11 分泌 AHLs 的最适温度为 28 °C, 高温和低温都会影响其 AHLs 的分泌。研究证实细菌的群体密度和外界环境因素能够调控嗜水气单胞菌 AHLs 的分泌。

关键词: 嗜水气单胞菌; 分离鉴定; 群体感应; N-酰基高丝氨酸内酯

文章编号: 1673-9078(2016)2-12-18

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.2.003

Isolation, Identification, Quorum Sensing, and AHL Activity of *Aeromonas hydrophila* under Different Conditions

LI Ting-ting¹, YANG Bing², LI Jian-rong²

(1. College of Life Science, Dalian Nationality University, Dalian 116600, China) (2. College of Food Science and Technology, Bohai University, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou, Liaoning 121013, China)

Abstract: One quorum sensing (QS) strain was isolated from spoilage bacteria of *Scophthalmus maximus* and by using classical tests and 16S rRNA gene analysis, it was determined to be *Aeromonas hydrophila*. The changes in the activity of N-acyl-homoserine lactones (AHLs) during the growth stages of the strain and the effect of different culture conditions on the secretion of AHLs were studied by the punch method. The results indicated that the strain Ah-11 could induce *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Agrobacterium tumefaciens* A136 to produce color. The activities of AHLs increased first and then decreased during the growth phase. The different carbon sources influenced the activity of AHLs in the following order: maltose> glucose> sucrose> fructose> lactose> xylose. The ability of Ah-11 to produce AHLs was reduced in weak acid and alkalescent environment; the optimum pH at which Ah-11 could secrete AHLs was pH 8.0. Higher concentrations of NaCl would not only inhibit the growth of Ah-11 but also inhibit the activity of AHLs. The concentration of NaCl (0.5~1.0 g/100g) had a significant effect on the ability of Ah-11 to secrete AHLs. The optimal temperature at which the Ah-11 strain could produce AHLs was 28 °C and relatively higher or lower temperatures could inhibit AHL secretion. Quorum sensing systems of Ah-11 were regulated by both the density of the bacteria and by environmental factors.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; isolation and identification; quorum sensing; N-acyl-homoserine lactones (AHLs)

收稿日期: 2015-04-06

基金项目: 国家自然科学基金 (31471639, 31301572); 中国博士后科学基金 (2014M52302); 高等学校博士学科点专项科研基金课题 (20113326130001); “十二五”国家支撑计划项目课题 (2012BAD29B06); 重庆市项目博士后资助 (Xm2014041)。

作者简介: 李婷婷 (1978-), 女, 博士后, 副教授, 主要从事水产品贮藏加工及质量安全控制方面的研究

通讯作者: 励建荣 (1964-), 男, 博士, 教授, 博导, 主要从事水产品和果蔬贮藏加工、食品安全方面的研究

大菱鲂属硬骨鱼纲, 碟形目鲆科, 我国俗称“多宝鱼”、“瘤棘鲆”, 原产于欧洲大西洋海域。我国自1992年引进至今, 现已形成年产量6万t的养殖规模, 占世界总产量的87.1%^[1], 是黄渤海地区的主要海水养殖鱼类之一。大菱鲆同时也是辽宁省重要的海水养殖经济鱼类之一, 养殖规模居全国第一位, 约占全国的50%。然而, 由于养殖者为了获得更高的经济效益, 通常采用加大养殖密度、喂养高蛋白饲料等手段, 这些手段往往会引起养殖池水水质的恶化、微生物的大量繁殖, 最终造成鱼体细菌感染, 严重时大量死亡, 损失巨大。因此, 分离鉴定养殖大菱鲆的病原菌, 探究影响其致病性的因素并寻求合适的治疗手段对大菱鲆养殖产业具有重要的意义。

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)属弧菌科、气单胞菌属(*Aeromonas*)^[2], 广泛分布在不同的水生环境中, 正常养殖条件下的水体及水产动物内均有检出, 是一种典型的人-兽-鱼共患病的环境致病菌, 能引起肠道综合征、创伤以及软组织感染和败血症等疾病^[3-4]。气单胞菌属的致病性与其产生的多种毒力因子如黏附素、细胞毒素、肠毒素以及胞外酶等密切相关^[5]。群体感应(QS)是细菌根据特定的自诱导化合物(Autoinducers, AI)的浓度来感知外界环境的变化, 当AI达到一定浓度阈值时, 会启动相关基因表达来适应环境变化的一种调控系统^[6]。研究发现, QS参与调控细菌的多种生活习性及其生理活性, 特别是致病菌毒力因子的表达以及抗菌药物与细菌素合成等生理特性^[7]。由于不同的AI调控不同的QS系统, 有效的控制AI的累积, 或与其受体进行识别和结合就可以抑制QS调控的毒力因子表达。因此, 研发以病原菌QS系统为靶点的新型药物可以更好地控制细菌群体感染以及预防细菌耐药性的产生, 为水生生物源致病菌的控制与预防提供新思路。

本研究以腐败大菱鲆中分离的一株嗜水气单胞菌为研究对象, 探究其生长阶段的AHLs分泌规律, 并研究不同的环境条件(碳源、pH、氯化钠质量浓度、培养温度)对菌株AHLs分泌的调控, 为开发抑制嗜水气单胞菌等致病菌的新型群体感应抑制剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验原料

大菱鲆, 购自锦州市林西水产市场, 平均重量 1.5 ± 0.3 kg。

1.1.2 实验菌株及培养条件

紫色杆菌 CV026(*Chromobacterium violaceum* CV026)、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* A136)和菌株 Ah-11 为渤海大学食品科学研究所保藏。紫色杆菌 CV026 和根癌农杆菌 A136 自身不产 AHLs, 当添加外源 AHLs 时, CV026 可以产生紫色菌素, 可以检测 C₄-C₈-HSL 的信号分子^[8]; A136 含有 P_{tral}-lacZ 融合基因, 表达 lacZ 基因, 可以分解 X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-吡喃半乳糖苷)产生蓝色反应, 对 C₄-C₁₄-HSL, 3-oxo-C₄-3-oxo-C₁₂ 均可以检测^[9]。

紫色杆菌 CV026、根癌农杆菌 A136 和菌株 Ah-11PF 均在 LB 肉汤或琼脂培养基中 28℃ 培养(肉汤培养摇床转速 160 r/min), CV026 添加 20 μg/mL 卡那霉素, A136 添加 4.5 μg/mL 四环素和 50 μg/mL 壮观霉素^[10]。

1.1.3 主要试剂和仪器

卡那霉素、四环素、壮观霉素、X-gal、C₆-HSL 购自 Sigma 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 引物, 上海生物工程公司; 其他试剂均为分析纯。

PCR 仪: 德国 Eppendorf 公司; Quantity One 凝胶成像系统: 美国 Bio-Rad 公司; 全自动微生物鉴定系统、Vitek 2 Compact 革兰氏阴性菌鉴定卡(GN test kit): 法国生物梅里埃公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株的 16S rRNA 鉴定

参考崔正翠等^[11]的方法对腐败大菱鲆进行细菌分离、纯化, 并对纯化后的菌株进行 16S rRNA 测序、鉴定。

1.2.2 菌株的群体感应 AHLs 检测

1.2.2.1 报告平板划线法

参考文献^[12]的方法, 待测菌株与紫色杆菌 CV026 或根癌农杆菌 A136 在 LB 平板上平行划线, A136 划线前必须在 LB 平板上涂布 20 μL X-gal (20 mg/mL), 无菌风吹干, 28℃ 恒温培养 24 h。报告菌株自身作阴性对照, C₆-HSL 作为阳性对照。

1.2.2.2 AHLs 粗体液的提取及活性检测

参考 Vatter DA 等^[13]方法进行并略做改动。

1.2.3 菌株生长动力学曲线测定以及相应培养时间 AHLs 活性

参考孙秀娇等^[14]方法进行并略做改动。

1.2.4 不同培养条件下菌株 AHLs 分泌规律

1.2.4.1 不同碳源对菌株 AHLs 分泌的影响

菌株 Ah-11 接种于 LB 肉汤培养基过夜活化, 按 1:500 比例接种于不同碳源液体培养基中, 28℃、160

r/min 振摇培养 24 h, 测定菌体密度(OD₅₉₅)。10000 r/min, 10 min 离心, 去上清, -4 °C 保存备用。不同碳源培养基: 参考王亚军等^[15]的培养基进行配置, 碳源 5.0 g/L、蛋白胨 10.0 g/L、牛肉膏 3.0 g/L、硫酸铵 5.0 g/L、磷酸氢二钾 1.5 g/L、硫酸锌 8.6 mg/L、硫酸镁 0.2 g/L、氯化钠 5.0 g/L, pH 调至 7.2~7.4。

1.2.4.2 培养温度对菌株 AHLs 分泌的影响

菌株 Ah-11 接种于 LB 肉汤培养基过夜活化, 按 1:500 比例接种于 LB 肉汤培养基中, 分别置于 10 °C、20 °C、28 °C、37 °C、42 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 测定菌体密度(OD₅₉₅)。10000 r/min, 10 min 离心, 去上清, -4 °C 保存备用。

1.2.4.3 其他因素对菌株 AHLs 分泌的影响

菌株 Ah-11 接种于 LB 肉汤培养基过夜活化, 按 1:500 比例接种于不同 pH 值和氯化钠质量浓度的 LB

肉汤培养基中, 28 °C、160 r/min 振摇培养 24 h, 测定菌体密度(OD₅₉₅)。10000 r/min, 10 min 离心, 去上清, -4 °C 保存备用。pH 值分别为: 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0; 氯化钠质量浓度为: 0.25、0.50、1.0、1.5、2.0、2.5、3 g/100 g。

1.2.5 数据分析

图表采用 Excel 2013 绘制, 系统发育树采用 MEGA 5.0 绘制。

2 结果与讨论

2.1 菌株生理生化试验

采用法国梅里埃全自动微生物鉴定系统鉴定菌株 Ah-11 为嗜水气单胞菌(VP 99)/豚鼠气单胞菌(VP 1), 菌株 Ah-11 的生理生化特征如表 1。

表 1 菌株 Ah-11 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain Ah-11

| 生理生化反应 | 结果 | 生理生化反应 | 结果 | 生理生化反应 | 结果 |
|------------------|----|----------------|----|--------------|----|
| 丙氨酸-苯丙氨酸-脯氨酸芳胺酶 | + | 谷氨酸-甘氨酸-精氨酸芳胺酶 | + | N-乙酰-β-半乳糖氨酶 | - |
| 侧金盏花醇 | - | β-木糖苷酶 | - | 琥珀酸盐产碱 | + |
| 吡咯烷基芳胺酶 | - | L-脯氨酸芳胺酶 | + | α-半乳糖苷酶 | - |
| L-阿拉伯醇 | - | 酯酶 | + | 磷酸酶 | - |
| D-纤维二糖 | - | 古老糖 | + | 氨基乙酸芳胺酶 | - |
| β-半乳糖苷酶 | + | 酪氨酸芳胺酶 | + | 鸟氨酸脱羧酶 | - |
| H ₂ S | - | 尿素酶 | - | 赖氨酸脱羧酶 | - |
| 谷氨酰芳胺酶 | - | D-山梨醇 | - | 组氨酸同化 | - |
| D-葡萄糖 | + | 蔗糖 | + | COURMARATE | + |
| γ-谷氨酰转移酶 | + | D-塔格糖 | - | β-葡萄糖苷酸酶 | - |
| 葡萄糖发酵 | + | D-海藻糖 | + | O/129 耐受 | + |
| β-葡萄糖苷酶 | - | 柠檬酸钠 | - | α-葡萄糖 | - |
| D-麦芽糖 | + | 丙二酸盐 | - | L-苹果酸盐同化 | - |
| D-甘露醇 | + | 5-酮-葡萄糖苷 | - | ELLMAN | - |
| D-甘露糖 | + | 乳酸盐产碱 | - | 乳酸盐同化 | - |
| β-N-乙酰葡萄糖苷酶 | + | β-丙氨酸芳胺酶 | - | | |

注: “+”= 90% 或以上的菌株为阳性; “-”= 90% 或以上的菌株为阴性。

2.2 16S rRNA 鉴定

将菌株 Ahh-01 的 16S rRNA 序列提交 NCBI 数据库进行 Blast 比对, 结果显示菌株 Ah-11 与嗜水气单胞菌序列相似度为 99%。用 MEGA 5.0 软件按照 Neighbour-Joining 聚类, 构建系统发育树如图 2 所示。根据 16S rRNA 序列分析并结合生理生化结果, 确定菌株 Ah-11 为嗜水气单胞菌。

2.3 菌株 Ah-11 的群体感应检测

图 3 显示的是报告菌株紫色杆菌 CV026 和根癌农杆菌 A136 分别与菌株 Ah-11 平行划线的结果。菌株 Ah-11 不仅能够诱导紫色杆菌 CV026 产生紫色菌素, 还可以促使根癌农杆菌 A136 水解 X-gal 发生蓝色反应。黄旭镇等^[16]采用 LC-MS/MS 对嗜水气单胞菌分泌 AHLs 进行定性和定量, 发现嗜水气单胞菌产生类型为 C₄-HSL~C₁₂-HSL 以及 3-oxo-C₆-HSL 的信号分子, 并且 C₄-HSL 的分泌最大。所以菌株 Ah-11 能够诱导两株报告菌株发生颜色反应。

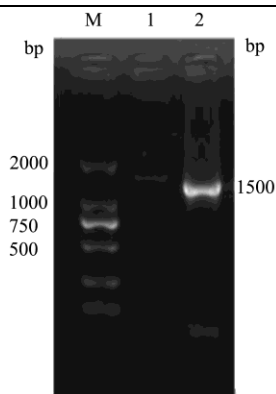


图1 16S rRNA PCR扩增产物及基因组电泳图

Fig.1 16S rRNA PCR amplification products and total DNA

注: M: Marker, 1对照, 2.Ah-11的基因组。

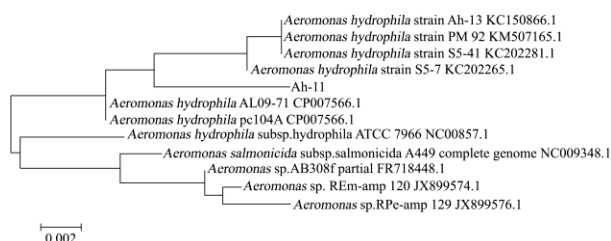


图2 菌株 Ah-11 与其他气单胞菌属之间的系统发育关系

Fig.2 The Phylogenetic relationships of strain Ah-11 and other

Aeromonas

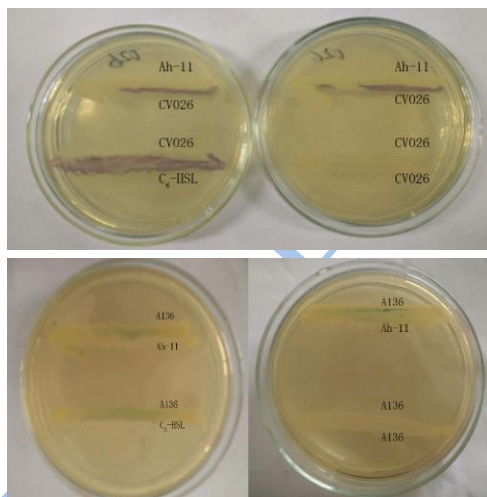


图3 报告平板划线检测信号分子

Fig.3 Streak assays for the production of AHLs in the test strain

2.4 生长动力学曲线及不同培养时间 AHLs 活性

图4显示, 菌株 Ah-11 在 4 h 后进入对数生长期, 大约持续 12 h。这与陈俭清等^[17]研究结果相似, 嗜水气单胞菌在 2 h 进入对数期生长并持续 10 h。菌株 Ah-11 分泌信号分子的能力比较强, 16~30 h 内 AHLs 活性处于较高水平, 在稳定中期(30 h)AHLs 活性最高。

Ah-11 分泌的 AHLs 量随着培养时间增加呈现先增大后减小的趋势, 且呈现密度依赖性。菌株 Ah-11 诱导 CV026 变色直径与细菌群体密度呈现一致性。

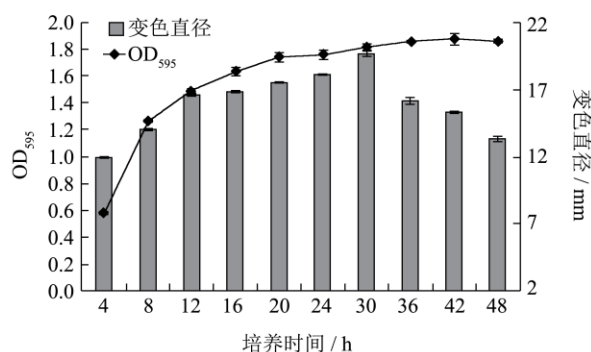
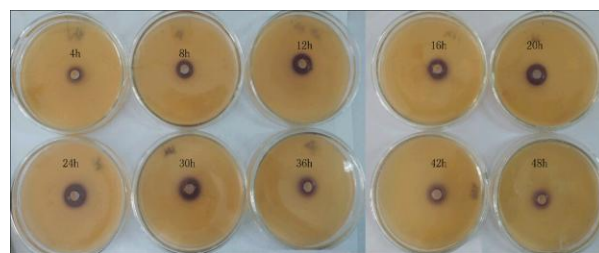


图4 菌株 Ah-11 生长动力学曲线与不同培养时间下 Ah-11 分泌 AHLs 的关系

Fig.4 Relationship between growth kinetics and AHL secretion under different culture times for strain Ah-11

2.5 不同碳源对嗜水气单胞菌 AHLs 活性的影响

使用不同碳源的肉汤培养基对菌株 Ah-11 分泌信号分子的影响如图5所示。菌株 Ah-11 在不同碳源培养基中培养 24 h 的菌液密度相差不大, 木糖培养基最有利于菌株的生长, 但是其 AHLs 的分泌量却是最小的, 其可能原因是群体感应属于细菌应急机制, 当细菌感受到外界环境不利时才会大量分泌 AHLs。根据诱导 CV026 变色直径可知, 麦芽糖可以促进菌株 Ah-11 信号分子的分泌, 不同碳源对 AHLs 分泌影响能力大小为: 麦芽糖>葡萄糖>蔗糖>果糖>乳糖>木糖。

2.6 不同 pH 值对嗜水气单胞菌 AHLs 分泌的影响

图6显示, 不同的环境 pH 对菌株 Ah-11 的 AHLs 分泌影响比较明显。菌株 Ah-11 在 pH 4.0 时基本处于不生长状态, 在 pH 8.0 时 AHLs 分泌量最大, pH 9.0 时 AHLs 分泌量很少。弱酸或者中性环境下对菌株 Ah-11 信号分子的分泌量影响不明显, 但弱酸环境下细菌群体密度要低于中性环境, 原因可能是不利的环

境(弱酸)可以刺激细菌群体感应应急机制而大量分泌 AHLs。菌株 Ah-11 的最适生长 pH 为 8.0, 这与杨广等^[18]的研究结果相似, 螯源嗜水气单胞菌最适的 pH 值为 6.5~7.5, 由于不同水生生物生活的环境不同, 所以不同来源的细菌最适 pH 也会略有不同。

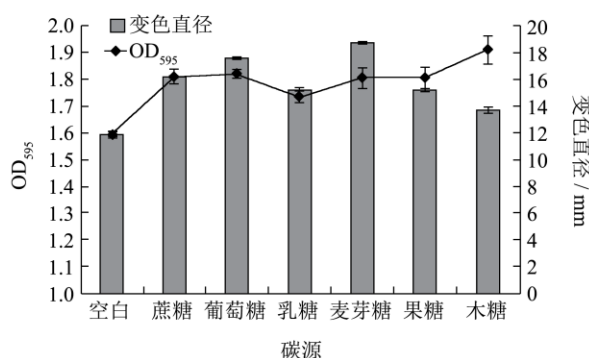
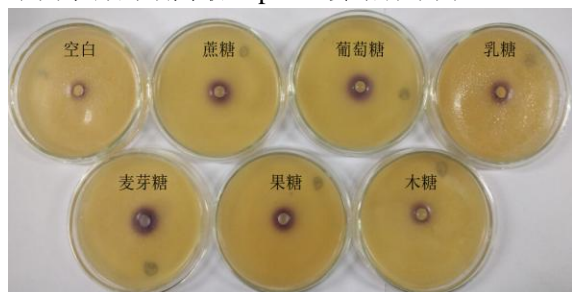


图5 不同碳源对 Ah-11 分泌 AHLs 的影响

Fig.5 Influence of different carbon sources on AHLs in strain Ah-11

2.7 不同氯化钠质量浓度对嗜水气单胞菌

AHLs 分泌的影响

图 7 显示的是氯化钠质量浓度与菌株 Ah-11 信号分子的分泌之间的关系, 可知高浓度的盐浓度会抑制细菌的生长, 当盐浓度达到 3.5 g/100 g 以上时细菌停止生长。菌株的最适生长环境以及最适的 AHLs 分泌环境在 0.5~1.0 g/100 g, 低盐浓度时 AHLs 分泌量较少, 在盐浓度在一定范围(0.25~1.5 g/100 g)时, 虽然菌株 Ah-11 分泌的 AHLs 差异明显, 但其菌液密度却差异不明显。

2.8 不同培养温度对嗜水气单胞菌 AHLs 分泌

的影响

温度对 Ah-11 的信号分子分泌影响比较显著(图 8)。菌株 Ah-11 分泌 AHLs 能力在 28 °C 最强, 低温会抑制 Ah-11 的生长, 同时 AHLs 的分泌量也非常少, 当温度大于 42 °C 时, Ah-11 处于休眠状态。培养温度在 37 °C 时 AHLs 的分泌明显低于 28 °C 的分泌量,

原因可能是高温会加速嗜水气单胞菌自身消耗 AHLs 或者抑制细菌产生 AHLs 的量。

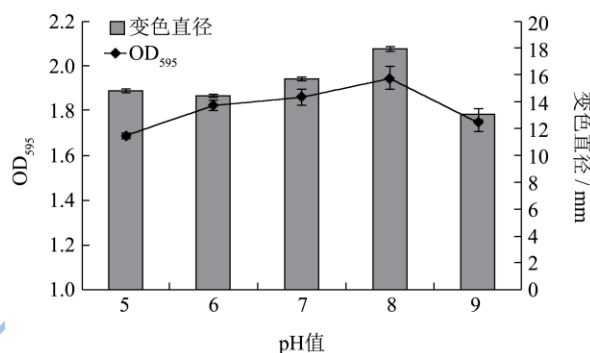
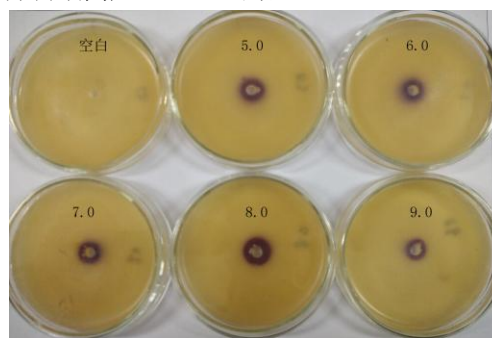


图6 不同 pH 对 Ah-11 分泌 AHLs 的影响

Fig.6 Influence of pH on AHLs in strain Ah-11

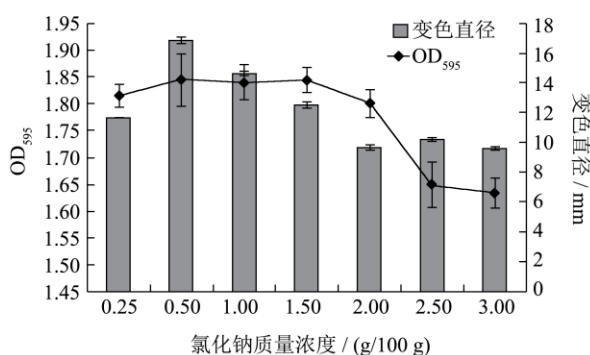
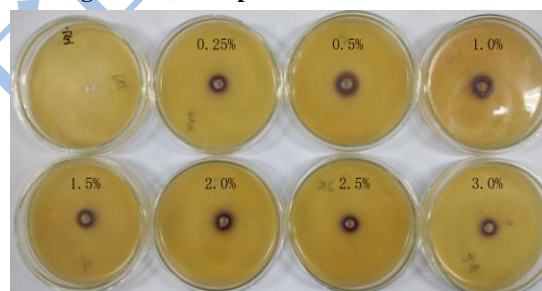


图7 不同氯化钠质量浓度对 Ah-11 分泌 AHLs 的影响

Fig.7 Influence of NaCl concentration on AHLs in strain Ah-11

3 结论

3.1 嗜水气单胞菌是常见的条件性致病菌, 广泛分布在淡水、污水、土壤和人类粪便等自然环境中, 能够感染鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳动物类等动物, 在动物疾病学和食品卫生学上具有非常重要的研

究价值。嗜水气单胞菌能够引起动物急性出血性败血症以及感染人类引起皮肤溃疡或肠炎等, 可以产生多种致病因子, 包括外毒素、胞外蛋白酶、S 层蛋白、脂多糖和菌毛等。研究表明, 这些致病因子(或部分)受到嗜水气单胞菌群体感应系统的调节, 信号分子主要是 C_4 -HSL 和 C_6 -HSL^[19-20]。何凤旭等^[21]采用斑马鱼口服高丝氨酸内酯酶 AI-96 对嗜水气单胞菌 NJ-1 浸浴攻毒的保护效应, 证实淬灭酶 AI-96 可以有效降低斑马鱼感染嗜水气单胞菌的死亡率。张美超等^[22]研究表明, N-酰基高丝氨酸内酯转移酶 AIO6 和嗜水气单胞菌(ATCC7966) 共培养的情况下, 可以有效抑制致病菌溶血素、细胞肠毒素、胞外蛋白酶、丝氨酸蛋白酶及磷脂酶 Pho 等毒力因子的表达。因此, 通过抑制致病菌的群体感应系统进而抑制其致病因子的表达将成为控制致病菌的新型治疗手段。

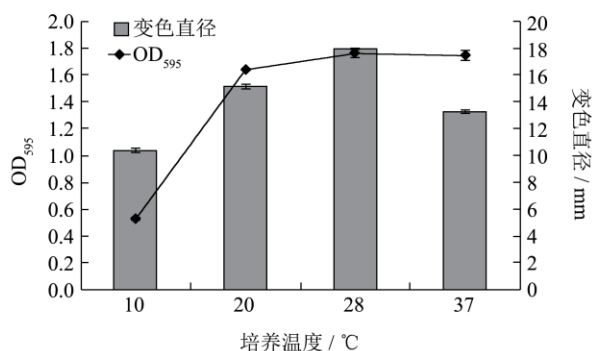
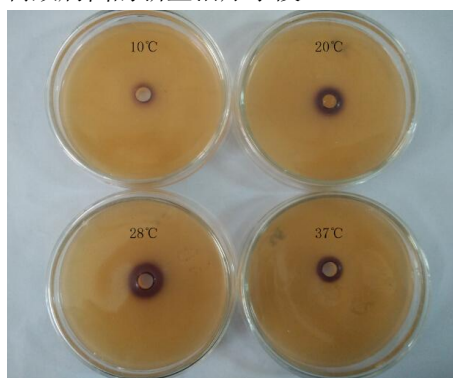


图8 不同培养温度对Ah-11分泌AHLs的影响

Fig.8 Influence of different culture temperature on AHLs in strain Ah-11

3.2 本论文探究了不同的环境因素对嗜水气单胞菌 QS 的调控规律。菌株 Ah-11 在生长阶段, AHLs 的分泌随时间呈密度依赖性, 且菌体密度和环境因素共同调控其 AHLs 的分泌。菌株 Ah-11 具有较强的 AHLs 分泌能力, 当环境条件不利时, Ah-11 也能分泌大量 AHLs, 启动相关基因以适应外界环境的变化对其 QS 产生的抑制或者调控, 进而达到保护菌群的目的。目前, 对嗜水气单胞菌的 QS 现象以及 QS 对其毒力因子的调控机理等仍需进一步研究, 但相信未来致病菌

的群体感应现象以及群体感应抑制剂将成为研究其致病机理的重要手段。

参考文献

- [1] 雷霖霖,刘新富,关长涛.中国大菱鲆养殖 20 年成就和展望[J].渔业科学进展,2012,33(4):123-130
LEI Ji-lin, LIU Xin-fu, GUANG Chang-tao. Turbot culture in chian for two decades: achievements and prospect [J]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(4): 123-130
- [2] Garrity G N, Bell J A, Lilbum T G. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. New York: Springer, 2004
- [3] Janda J M, Abbott S L. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2010, 23(1): 35-73
- [4] M Pablos, G Huys, M Cnockaert, et al. Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 147(4): 203-210
- [5] Inam Akhtar Hussain, Geevaretnam Jeyasekaran, Robinson Jeya Shakila, et al. Prevalence of hemolytic and enterotoxigenic aeromonas spp. in healthy and diseased freshwater food fishes as assessed by multiplex PCR [J]. Advanced Food Science and Technology, 2013, 8(1):70-85
- [6] Waters C M, Bassler B L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria [J]. Ann. Rev. Cell and Dev. Bi., 2005, 21: 319-346
- [7] Kumar L, Chhibber S, Kumar R, et al. Zingerone silences quorum sensing and attenuates virulence of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Fitoterapia, 2015, 102: 84-95
- [8] 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
- [9] Zhu J, Beaver JW, Mor éMI, et al. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibits activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(20): 5398-5405
- [10] Rice SA, Koh KS, Queck SY, et al. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues [J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(10): 3477-3485
- [11] 崔正翠,许钟,杨宪时,等.冷藏大菱鲆细菌组成变化和优势腐败菌[J].食品科学,2011,32(13):184-187

- CUI Zheng-cui, XU Zhong, YANG Xian-shi, et al. Change of bacterial flora and predominant spoilage bacteria in *scophthalmus maximus* during chilled storage [J]. Food Science, 2011, 32(13): 184-187
- [12] Chu W, Vatter DA, Maitin V, et al. Bioassays of quorum sensing compounds using *Agrobacterium tumefaciens* and *Chromobacterium violaceum* [M]. Quorum Sensing. Humana Press, 2011
- [13] Vatter DA, Mihalik K, Crixell SH, et al. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors [J]. Fitoterapia, 2007, 78(4): 302-310.
- [14] 孙秀娇,朱素芹,张彩丽,等.凡纳滨对虾源不动杆菌群体感应信号分子分离鉴定及其调控[J].微生物学通报,2015, 42(2): 437-443
- SUI Xiu-jiao, ZHU Su-qin, ZHANG Cai-li, et al. Isolation, identification and regulation of quorum sensing signal molecules of *Acinetobacter* in *Litopenaeus vannamei* [J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 437-443
- [15] 王亚军,孙豪,王芳,等.不同碳源对嗜水气单胞菌生长的影响[J].四川农业大学学报,2014, 32(3): 321-325
- WANG Ya-jun, SUI Hao, WANG Fang, et al. Effect of different carbon sources on the growth of *Aeromonas hydrophila* [J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2014, 32(3): 321-325
- [16] 黄旭镇,朱军莉,赵二科,等.LC-MS/MS 检测水产品源致病细菌和腐败菌群体感应 AHLs 信号分子[J].水产学报,2014, 38(7):1040-1046
- HUANG Xu-zhen, ZHU Jun-li, ZHAO Er-ke, et al. Detection of N-acylated-L-homoserine lactones of quorum sensing secreted by pathogen and spoilage bacteria from aquatic product using liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(7): 1040-1046
- [17] 陈俭清,卢彤岩,刘红柏,等.恩诺沙星对嗜水气单胞菌的体外药效学研究[J].水产学杂志,2010, 23(1): 48-59
- CHEN Jian-qing, LU Tong-yan, LIU Hong-bai, et al. Pharmacodynamics of enrofloxacin on *Aeromonas hydrophila* in Vitro [J]. Chinese Journal Fisheries, 2010, 23(1): 48-59
- [18] 杨广,余文斌,刘金兰,等.嗜水气单胞菌适宜 pH 值和温度的测定[J].内陆水产,2000,8: 36-37
- YANG Guang, YU Wen-bin, LIU Jin-lan, et al. Determine the comfortable pH and temperature of *aeromonas hydrophila* [J]. Inland Fisheries, 2000, 8: 36-37
- [19] Bi Z X, Liu Y J, Lu C P. Contribution of AhyR to virulence of *aeromonas hydrophila* J-1 [J]. Research in Veterinary Science, 2007, 83(2): 150-156
- [20] Grade C, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Quorum sensing regulation in *Aeromonas hydrophila* [J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 396(4): 849-857
- [21] 何凤旭,张美超,徐俐,等.高丝氨酸内酯酶 AI-96 对嗜水气单胞菌 NJ-1 浸浴攻毒斑马鱼保护效应[J].水产学报, 2013, 37(1): 94-100
- HE Su-xu, ZHANG Mei-chao, XU Li, et al. Effect of quorum-quenching enzyme from *Bacillus* sp AI-96 on *Aeromonas hydrophila* NJ-1 bath challenge in zebrafish [J]. Journal of Fisheries of China, 2013, 37(1): 94-100
- [22] 张美超,曹雅男,姚斌,等.淬灭酶 AiiO-AIO6 酶学性质及对嗜水气单胞菌毒力因子的表达调控[J].水产学报,2011, 35(11): 1720-1728
- ZHANG Mei-chao, CAO Ya-nan, YAO Bin, et al. Characteristics of quenching enzyme AiiO-AIO6 and its effect on *Aeromonas hydrophila* virulence factors expression [J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(11): 1720-1728