

# 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

马艳<sup>1</sup>, 李婷婷<sup>2,3</sup>, 崔方超<sup>1</sup>, 杨兵<sup>1</sup>, 刘明爽<sup>1</sup>, 励建荣<sup>1</sup>

(1. 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, 辽宁锦州 121013) (2. 大连民族大学生命科学院, 辽宁大连 116600) (3. 西南大学食品学院, 重庆 400715)

**摘要:** 本文以腐败大菱鲆中分离得到的一株具有群体感应现象的细菌为研究对象, 通过生理生化试验及 16S rRNA 鉴定其为蜂房哈夫尼亚菌 (*Hafnia alvei*, Ha-01)。利用检测菌株紫色杆菌 CV026 及根瘤农杆菌 A136 进行平行划线检测其信号分子 (N-酰基高丝氨酸内酯, AHLs), 并利用平板打孔法研究其分泌 AHLs 动力学及不同生长阶段生物被膜产生量, 同时通过添加外源信号分子研究 AHLs 与生物被膜形成的关系。结果显示, 菌株 Ha-01 能够产生群体感应现象, 在培养过程中信号分子产生量呈现先升高后降低的趋势, 且在 16 时达到最大值; 生物被膜产生量与培养时间呈正相关, 在 72 时达到最大值, 然后逐渐趋于稳定, 且添加外源 AHLs 标准品能够促进生物被膜的形成。研究证实, 菌株 Ha-01 能够产生群体感应现象且能够调控生物被膜的形成。

**关键词:** 大菱鲆; 蜂房哈夫尼亚菌; 体感应; 酰基高丝氨酸内酯; 生物被膜

文章编号: 1673-9078(2016)8-70-76

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.011

## Study of Quorum Sensing and Biofilm Formation of *Hafnia alvei* Separated from Turbot

MA Yan<sup>1</sup>, LI Ting-ting<sup>2,3</sup>, CUI Fang-chao<sup>1</sup>, YANG Bing<sup>1</sup>, LIU Ming-huang<sup>1</sup>, LI Jian-rong<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, Jinzhou 121013, China)

(2. College of Life Science, Dalian Nationality of University, Dalian 116600, China)

(3. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** One quorum-sensing (QS) strain separated from a spoiled turbot sample was used as the study object and determined as *Hafnia alvei* (Ha-01) according to physiological and biochemical tests and 16S rRNA analysis. The QS compounds [N-acyl-homoserine lactones (AHLs)] were detected by parallel-streak method using *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Agrobacterium tumefaciens* A136. Additionally, the plate-diffusion method was used to study the kinetics of AHL secretion and the amount of biofilm produced in different growth phases, and exogenous signaling molecules were added to study the relationship between AHLs and biofilm formation. The results indicated that strain Ha-01 produced QS phenomena, and the number of AHLs produced by Ha-01 during cultivation exhibited a downward trend after the initial increase, reaching the maximum at 16 h. The amount of biofilm formed was positively correlated with incubation time and reached a maximum at 72 h, followed by gradual stabilization. The addition of exogenous AHL strands could promote the production of biofilm. These results indicated that strain Ha-01 was capable of producing QS phenomena and regulating biofilm formation.

**Key words:** biofilm; *Hafnia alvei*; N-acyl-homoserine lactones; quorum sensing; turbot

收稿日期: 2015-07-02

基金项目: 国家自然科学基金 (31471639, 31301572); 中国博士后科学基金 (2014M552302); 高等学校博士学科点专项科研基金课题 (优先发展领域 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: 马艳 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品贮藏加工与质量安全控制

通讯作者: 励建荣 (1964-), 男, 博士, 教授, 博导, 研究方向: 水产品果蔬贮藏加工、食品安全; 李婷婷 (1978-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 水产品贮藏加工及安全控制

蜂房哈夫尼亚菌 (*Hafnia alvei*), 肠杆菌科哈夫尼亚属唯一的一种细菌, 革兰氏阴性杆菌, 兼性厌氧, 运动性, 有鞭毛, 主要存在于人和动物的粪便, 自然界水和土壤中。该菌可以从奶、肉、鱼产品中分离得到, 是一种常见的细菌性食品污染菌, 能够形成生物被膜<sup>[1]</sup>。喜好厌氧潮湿的环境, 在真空包装条件下冷藏环境中生长良好, 4 °C左右仍可以正常生长繁殖, 从而引起肉制品的腐败变质<sup>[2]</sup>。同时, 它也是一种条件致病菌, 在特定的条件下可引起多种疾病感染, 例如严重的腹泻、败血症、伤口感染、化脓、泌尿、呼吸障碍等<sup>[3-4]</sup>。该菌常与志贺氏菌、侵袭性大肠埃希氏菌等肠道致病菌的血清有交叉凝集反应而易被误诊。因此, 探究引起其致病性的因素变得十分重要。许多研究表明, 蜂房哈夫尼亚菌能够产生信号分子, 其群体感应活性与食品腐败及生物被膜形成相关<sup>[5]</sup>。

群体感应 (Quorum Sensing, QS) 是一种细菌之间进行相互交流的通讯机制, 许多细菌能够合成并释放一种叫做自诱导剂 (Autoinducer, AI) 的信号分子, 当其浓度较低时, 它不足以诱导目的基因的表达, 但是当细菌种群密度达到一定阈值时, 信号分子可引起相关基因的协调表达, 并控制一系列的生理学过程<sup>[6-7]</sup>。近年来一些研究表明许多食品腐败和致病性生物体, 如大肠杆菌 O157, H7、肠道沙门氏菌、铜绿假单胞菌, 都受到 QS 系统的调控, 产生许多生理特征, 包括产生色素、群集运动、生物被膜形成、分泌毒素以及生产降解酶等<sup>[8]</sup>。其中有些关于植物或人类致病菌的研究表明, 在许多细菌中, 群体感应信号分子是其毒性因子及其它一些性能的一个重要组成成分, 包括促进生物被膜的产生、产生毒力因子等<sup>[9]</sup>。因此微生物的群体感应现象可能与食品腐败相关, 而且当生物被膜形成时还严重威胁着食品安全<sup>[10]</sup>。尽管许多产品中都存在 QS 现象<sup>[11]</sup>, 但是对蜂房哈夫尼亚菌群体感应现象研究较少, 因此研究蜂房哈夫尼亚菌的群体感应现象具有十分重要的意义。

本实验以腐败大菱鲆中分离得到的一株蜂房哈夫尼亚菌为研究对象, 检测了其群体感应现象, 并对其分泌 AHLs 的动力学及其生长阶段生物被膜的变化进行了研究, 以及外源信号分子对其生物被膜产生量的影响。该研究为进一步明晰蜂房哈夫尼亚菌的群体感应现象及开发新型群体感应抑制剂提供一定理论基础。

## 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  $1.5 \pm 0.2$  kg。

#### 1.1.2 试验菌株及培养条件

紫色杆菌 CV026 (*Chromobacterium violaceum* CV026)、根癌农杆菌 A136 (*Agrobacterium tumefaciens* A136) 以及待测菌株 Ha-01 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 自身都不产 AHLs。当添加外源 AHLs 时, CV026 可产生紫色菌素; A136 可以分解 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-吡喃半乳糖苷) 产生蓝色反应。

所有菌株均在 LB 液体培养基中, 28 °C、160 r/min 摇床过夜培养活化, CV026 活化时需添加卡那霉素 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , A136 活化时需添加 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  壮观霉素和 4.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  四环素。

#### 1.1.3 试剂及实验设备

主要试剂: 卡那霉素、四环素、壮观霉素、C<sub>4</sub>-HSL、C<sub>6</sub>-HSL、X-gal, 购于 Sigma 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 引物, 购于上海生物工程公司; 其它常规试剂均为分析纯。

主要仪器设备: 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; PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司; Quantity One 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; MS105UD 电子分析天平, 瑞士梅特勒-托利多有限公司; MLS-3020 高压蒸汽灭菌, 日本三洋公司; Imark 酶标仪, 美国 BIO-RAD; HZQ-X300C 型恒温振荡器, 上海一恒科技有限公司; BPS-100CA 恒温恒湿培养箱, 上海一恒科技有限公司; Biofuge Stratos 冷冻高速离心机, 美国 THERMO 公司; UV-2700 紫外可见分光光度计, 日本岛津公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌株的 16S rRNA 鉴定

用平板划线法从腐败的大菱鲆中分离、纯化出具有群体感应现象的菌株 Ha-01, 并对其革兰氏染色及生理生化鉴定。将纯化后的菌株 Ha-01 过夜活化, 然后利用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取基因组 DNA, 将所得 DNA 采用 25  $\mu\text{L}$  PCR 体系进行扩增: Taq PCR Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , Sterilizer ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ , 引物各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ 。PCR 引物采用 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, 1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT。反应条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 95 s, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物采用

0.15%琼脂糖凝胶电泳成像并观察结果。将 PCR 扩增产物送至上海生工生物工程股份有限公司测序。

### 1.2.2 菌株 AHLs 的检测

参考文献<sup>[12]</sup>的方法并稍作改进,采用报告平板划线法进行检测。将待测菌株及 AHLs 微生物传感菌紫色杆菌 CV026 和根瘤农杆菌 A136 采用 LB 肉汤过夜活化后,在 LB 平板上进行平行划线,A136 划线前必须在 LB 平板上涂布 20 μL X-gal (20 mg/mL),28 °C 过夜培养。将 C<sub>4</sub>-HSL 和 C<sub>6</sub>-HSL 分别作为阳性对照,报告菌株自身作为阴性对照。

### 1.2.3 菌株生长曲线及 pH 测定

将待测菌株过夜活化后,接种于 LB 液体培养基中,28 °C,160 r/min 摇床过夜培养。每隔 4 h 取样,测定各菌株在 595 nm 的吸光值,同时测培养液的 pH。

### 1.2.4 菌株 Ha-01 分泌 AHLs 动力学

参考文献<sup>[13]</sup>的方法并稍作修改进行测定。将待测菌株过夜活化后接种到 LB 液体培养基中,28 °C,160 r/min 摇床过夜培养后的菌液,每隔 4 h 取样后,10000 r/min,10 min 离心取上清液。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 μL 上清液,28 °C 培养 24 h。

### 1.2.5 生物被膜的测定

根据刘尊英<sup>[14]</sup>等人的方法稍作修改。将待测菌株过夜培养后,与培养基按 1:1000 比例混合均匀。取 0.5 mL 分装至灭菌的离心管中,以无菌培养基作为对照,每组 3 个平行,28 °C 静置培养。每次进行测定时,先小心移除菌液,用无菌蒸馏水清洗 3 次,然后每管加入 500 μL 0.1% 结晶紫溶液染色 30 min,弃去染液,再用无菌蒸馏水清洗 3 次,无菌风或 60 °C 干燥后,每管加入 95% 乙醇溶解 5 min 后,测定 595 nm 处的吸光值。另加入一定体积的外源标准信号分子(100 μg/mL C<sub>6</sub>-HSL),28 °C 培养 24 h,进行清洗染色,在与液面交界处,细菌形成坚固的附着膜,水冲不掉则被结晶紫染色,95% 乙醇溶解 5 min 后测定 595 nm 处吸光值。

### 1.2.6 数据分析

实验数据采用 Excel 统计软件处理,绘图采用 Origin8.6 绘制,系统发育树采用 MEGA5.0 绘制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株生理生化试验

表 1 菌株 Ha-01 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the test strain, Ha-01

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	-	β-N-乙酰葡萄糖苷酶	+	谷氨酸-甘氨酸-精氨酸	-
酸芳胺酶	-			酸芳胺酶	-
侧金盏花醇	-	β-丙氨酸芳胺酶	-	N-乙酰-β-半乳糖氨酶	-
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 <sub>2</sub> S	-	尿素酶	-	赖氨酸脱羧酶	+
β-木糖苷酶	-	D-山梨醇	-	组氨酸同化	-
谷氨酰芳胺酶	-	蔗糖	-	COURMARATE	-
D-葡萄糖	+	D-塔格糖	-	β-葡萄糖苷酸酶	-
γ-谷氨酰转移酶	+	D-海藻糖	+	O/129 耐受	+
葡萄糖发酵	+	柠檬酸钠	+	琥珀酸盐产碱	+
β-葡萄糖苷酶	-	丙二酸盐	-	L-苹果酸盐同化	-
D-麦芽糖	+	5-酮-葡萄糖苷	-	ELLMAN	+
D-甘露醇	+	乳酸盐产碱	+	L-乳酸盐同化	-
D-甘露糖	+	α-葡萄糖	-		

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性。

对菌株 Ha-01 进行革兰氏染色及生理生化鉴定结果显示,菌株 Ha-01 为革兰氏阴性杆菌、无荚膜、无芽孢,在普通营养培养基上能生长,菌落光滑、边缘

整齐。

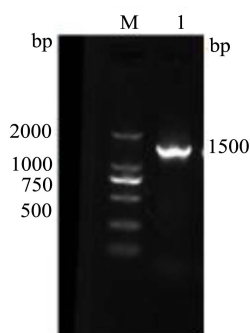
采用法国梅里埃全自动微生物鉴定系统鉴定出待测菌株为蜂房哈夫尼亚菌,相似度达 99%,菌株

Ha-01 的生理生化特征如表 1 所示。

### 2.2 16S rRNA 基因扩增及测序结果

对菌株 Ha-01 的 16S rRNA 基因片段进行 PCR 扩增，扩增结果如图 1 所示。

然后将菌株 Ha-01 的 16S rRNA 序列提交到 NCBI 数据库进行 Blast 比对，结果显示 Ha-01 与蜂房哈夫尼亚菌相似度达 99%。用 MEGA 5.0 软件按照 Neighbour-Joining 聚类所构建的系统发育树如图 2 所示。根据菌株 Ha-01 的 16S rRNA 序列分析结果，可确定该菌株为蜂房哈夫尼亚菌。



M:Marker 1:Ha-01的基因组

图 1 16S rRNA PCR 扩增产物及基因组电泳图

Fig.1 Electrophoresis patterns of 16S rRNA PCR-amplification products and total DNA

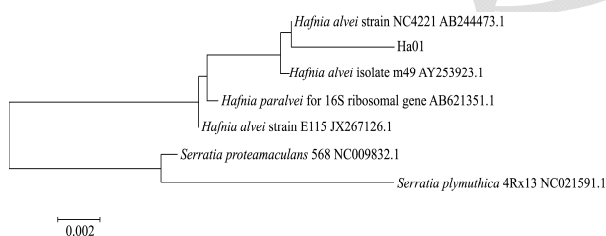


图 2 基于 16S rRNA 基因序列 Ha-01 的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence analysis of strain Ha-01

### 2.3 菌株群体感应现象检测

紫色杆菌 CV026 是 *cvil*: mini-Tn5 突变体，本身不产生 AHLs，也不产生紫色，C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>-HSL 细菌生物感应器，具有卡那霉素抗性。当外源 AHLs 存在时，AHLs 分子则能够和含有相应靶启动子的序列结合在一起，使报告基因进行转录和表达，促使紫色杆菌分泌紫色色素，对酰基侧链长度为 C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub> 的 AHLs 不同程度地敏感<sup>[15]</sup>；根癌农杆菌 A136，含有 *PtraI-lacZ* 融合基因和 *traR* 基因，本身也不产生 AHLs，但含有产色素的基因，当遇到外源的 AHLs 时，*lacZ* 基因能够进行表达，水解 X-gal 等底物，使产色素基因表达产生色素，A136 对 C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub>-HSL，3-oxo-C<sub>4</sub>-3-oxo-C<sub>12</sub> 均

可以检测<sup>[16-17]</sup>。由图 3 可知菌株 Ha-01 不仅能够诱导紫色杆菌 CV026 产生紫色色素，还能够诱导根癌农杆菌 A136 水解 X-gal 产生蓝色。这与 Tan<sup>[4]</sup>等的研究结果相似，说明菌株 Ha-01 产生的信号分子既有短链的 AHLs，又有长链或是酰基侧链 C-3 有羰基取代的 AHLs。

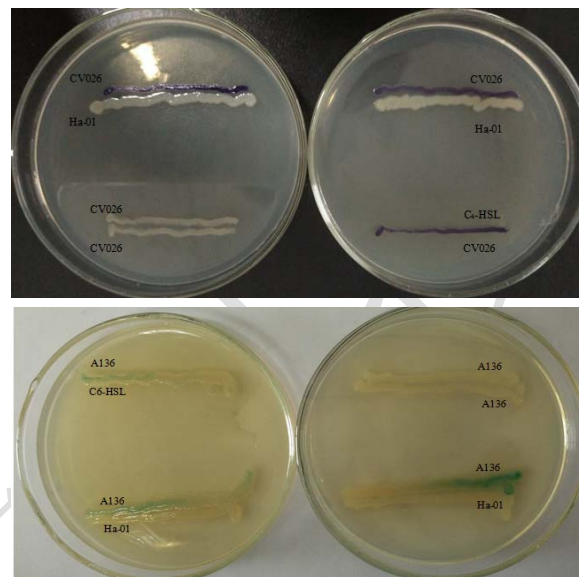


图 3 报告平板划线检测信号分子

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

### 2.4 菌株 Ha-01 生长动力学曲线及不同生长阶段 AHLs 活性

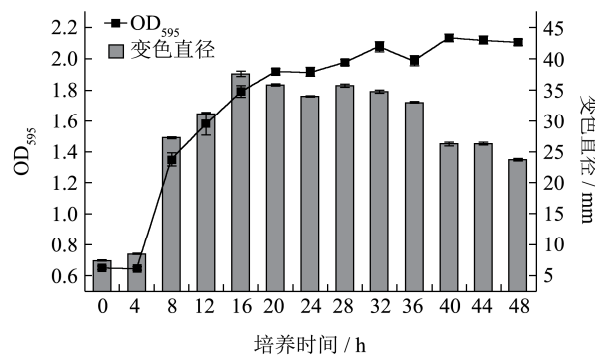
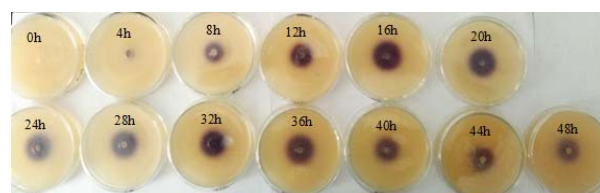


图 4 菌株 Ha-01 生长动力学曲线与不同培养时间下 AHL 产生量的关系

Fig.4 Relationship between growth kinetics and AHL secretion under different Ha-01 culture times

待测菌株 Ha-01 的生长动力学曲线及不同生长阶

段 AHLs 活性变化如图 4 所示。由图可知, 0~4 h 为菌株生长的延滞期, 菌体开始适应生长环境并进行调整; 在 4~20 h 时进入到对数生长期, 此时菌株已经适应新的生长环境, 且培养基中营养物质丰富, 菌体快速增长; 20 h 之后进入稳定期和衰亡期。随着菌株不同生长阶段菌体密度的不同, 其 AHLs 产生量也不断变化, 在整个生长阶段呈现先增大后减小的趋势, 在 0~4 h 内, 菌株处于延滞期时, 信号分子的产生量较少; 在 4~16 h 内菌株分泌信号分子的量随菌体密度增大急速增加, 且在 16 h 时分泌的信号分子达到最大量; 然后随着菌株进入稳定期其分泌信号分子量也基本处于稳定水平; 但是在 36 h 后菌株分泌信号分子量开始减小。菌株 Ha-01 在整个生长阶段 AHLs 分泌量呈现密度依赖性, 这与孙秀娇等<sup>[18]</sup>的研究结果相似。

### 2.5 不同生长阶段 pH 与分泌 AHLs 动力学

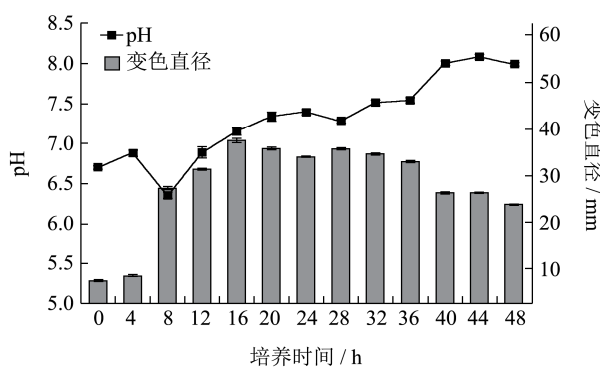


图 5 Ha-01 株培养过程中 pH 变化与 AHLs 分泌量关系

Fig.5 Relationship between pH and the activities of AHLs under different Ha-01 culture times.

菌株 Ha-01 培养过程中 pH 及不同生长阶段 AHLs 活性变化情况如图 5 所示。由图可知在菌体生长延滞期内 pH 开始升高, 但是进入对数生长期后 pH 却呈现先降低后升高的趋势, 在 8 h 时 pH 降低到 6.35, 之后在 8~36 h 内 pH 一直呈现上升趋势, 此时信号分子产生量基本不受 pH 值影响; 在 40 h 时 pH 升高到 8.00 左右, 此后基本维持不变, 而信号分子产生量也随之减少。根据綦国红等<sup>[19]</sup>研究的食源假单胞群体感应信号分子的影响可知, 菌体生长进入稳定期后, AHLs 浓度的变化与外界环境中 pH 的变化有着密切关系。AHLs 分子是由一个酰基侧链与一个高丝氨酸内酯环相连接, 酸性条件下该结果稳定, 但是强碱条件会导致高丝氨酸内酯环开环, 从而破坏其结构, 使其失去信号分子作用<sup>[20]</sup>。

### 2.6 生物被膜测定

#### 2.6.1 不同培养时间生物被膜产生量

生物被膜是微生物为适应外界环境而附着于物体的表面, 通过产生一些多糖、蛋白质和核酸等, 将自身包裹其中而形成的具有一定形状的群体膜状物<sup>[21]</sup>。在生物被膜的保护下, 细菌可以抵抗外界环境的挑战, 包括抗生素、防腐剂及宿主自身的免疫系统等, 从而有利于自身的生长繁殖<sup>[22]</sup>。根据 Jack 等<sup>[23]</sup>的研究结果可知, 蜂房哈夫尼亚菌能够通过形成生物被膜来抵抗外界环境的挑战, 维持自身的生长繁殖。如图 6 所示, 为不同培养时间条件下待测菌株 Ha-01 生物被膜产生量的变化情况。由图可知, 菌株 Ha-01 在 0~12 h 内生物被膜产生量非常少, 为生物被膜形成的附着期; 24~72 h 生物被膜产生量快速上升, 生物被膜处于形成期; 72 h 后生物被膜形成量基本处于稳定阶段, 此时生物被膜进入成熟稳定期。Pumbwe 等<sup>[24]</sup>的研究表明生物被膜形成是一个动态过程, 在形成过程中能够受到其 QS 系统的调控。

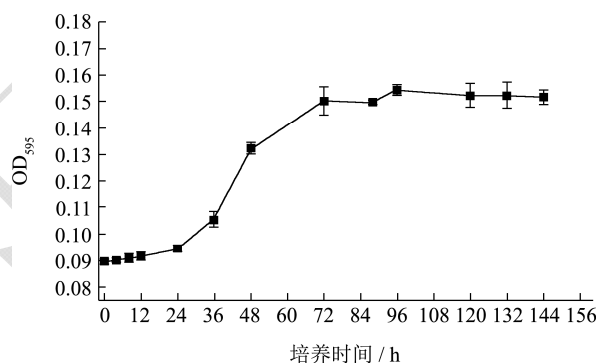


图 6 不同培养时间下菌株 Ha-01 生物被膜产生量的生长曲线

Fig.6 Growth curve of Ha-01 biofilm formation at different culture times

#### 2.6.2 外源标准信号分子对生物被膜形成的影响

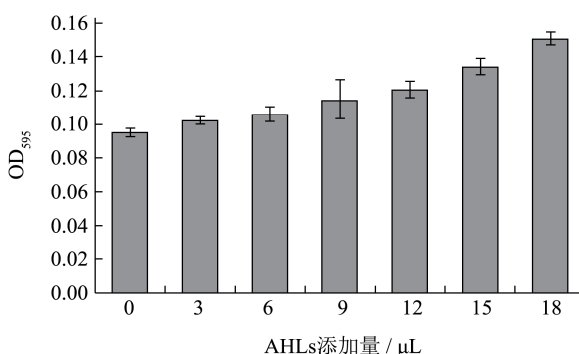


图 7 外源标准 AHLs 对菌株 Ha-01 生物被膜形成的影响

Fig.7 Effects of exogenous AHLs on the biofilm of Ha-01 Effects of exogenous AHLs on Ha-01 biofilm formation

为了进一步验证待测菌株 Ha-01 群体感应系统对生物被膜的调控作用, 添加不同体积的外源信号分子标准品(100 μg/mL C<sub>6</sub>-HSL)到培养菌株 Ha-01 所用培养



基中, 然后通过测定595 nm处的吸光值来反映其对菌株生物被膜产生的调控。根据Nina等<sup>[25]</sup>人的报道可知, 由AHLs介导的微生物QS系统在其生物被膜的形成、附着以及固定的过程中起着关键性作用。由图7可知, 当添加外源AHLs标准品后, 菌株Ha-01生物被膜产生量随着添加量的增加而增加。这与刘尊英<sup>[14]</sup>等关于外源信号分子对不动杆菌菌株Aci-1生物被膜影响的研究结果相类似。说明外源标准AHLs可以促进菌株Ha-01的生物被膜形成, 且呈密度依赖性。即菌株Ha-01生物被膜的形成受到AHLs的影响。且由图8及表2可知, 以外源标准信号分子添加量为自变量, 菌株Ha-01生物被膜产生量为拟合目标进行曲线拟合时, 外源信号分子添加量与菌株Ha-01生物被膜产生量具有很好的相关性, R为0.93603, ( $p < 0.01$ ), 呈极显著相关。

### 3 结论

本论文研究了菌株 Ha-01 的群体感应现象及其 QS 系统对生物被膜的调控, 研究结果表明菌株 Ha-01 不仅可以诱导紫色杆菌 CV026 产生紫色色素, 还能够诱导根癌农杆菌 A136 水解 X-gal 产生蓝色; 添加外源

AHLs 能够促进其生物被膜的形成。由此可知菌株 Ha-01 能够分泌多种 AHLs, 具有群体感应现象。其信号分子产生量在培养过程中呈现密度依赖性; 生物被膜产生量随着培养时间的延长不断增加, 并受到其 QS 系统的调节。因此, 研究蜂房哈夫尼亚菌的群体感应现象对进一步研究其致病机理, 并研发新型群体感应抑制剂具有重要意义。

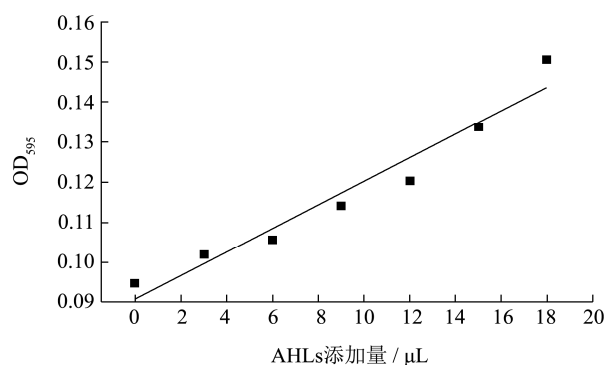


图8 外源标准AHLs添加量与菌株Ha-01生物被膜产生量相关性分析图

Fig.8 Correlation-analysis plot of the amount of added exogenous AHLs and the amount of biofilm produced by Ha-01

表2 外源标准AHLs添加量与生物被膜产生量回归方程相关参数

Table 2 Related parameters in the regression equation related to the amount of added exogenous AHLs and the amount of produced biofilm

相关参数	A截距及其标准差 $S_a$	B斜率及其标准差 $S_b$	R相关系数	SD回归标准差	PR为0的概率
外源AHLs添加量与生物被膜产生量线性回归方程	0.09093	0.00293	0.93603	0.00336	2.27136E-4

### 参考文献

[1] Vivas J, Padilla D, Real F, et al. Influence of environmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains [J]. Veterinary Microbiology, 2008, 129(1): 150-155

[2] 张旭东, 闫超杰, 孙剑, 等. 冷鲜牛肉中蜂房哈夫尼亚菌 (*Hafnia alvei*) 的分离与鉴定[J]. 微生物学杂志, 2010, 3: 106-108

ZHANG Xu-dong, YAN Chao-jie, SUN Jian, et al. Isolation and Identification of *Hafnia alvei* in Refrigerated Fresh Beef [J]. Journal of Microbiology, 2010, 3: 106-108

[3] Padilla D, Remuzgo-Martínez S, Acosta F, et al. *Hafnia alvei* and *Hafnia paralvei*. Taxonomy defined but still far from virulence and pathogenicity [J]. Veterinary Microbiology, 2013, 1(163): 200-201

[4] Tan J Y, Yin W F, Chan K G. Quorum Sensing Activity of *Hafnia alvei* isolated from packed food [J]. Sensors, 2014, 14(4): 6788-6796

[5] Viana E S, Campos M E M, Ponce AR, et al. Biofilm formation and acyl homoserine lactone production in *Hafnia alvei* isolated from raw milk [J]. Biological Research, 2009, 42(4): 427-436

[6] Solano C, Echeverez M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing [J]. Current Opinion in Microbiology, 2014, 18: 96-104

[7] Antunes L C M, Ferreira R B R, Buckner M M C, et al. Quorum sensing in bacterial virulence [J]. Microbiology, 2010, 156(8): 2271-2282

[8] Zhang J, Rui X, Wang L, et al. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation [J]. Food Control, 2014, 42: 125-131

[9] Nadell C D, Xavier J B, Levin S A, et al. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms [J]. PLOS Biology, 2008, 6(1): 171-179

[10] Blana V A, Nychas G J E. Presence of quorum sensing signal molecules in minced beef stored under various temperature and packaging conditions [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 173: 1-8

- [11] Skandamis P N, Nychas G J E. Quorum sensing in the context of food microbiology [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5473-5482
- [12] CHU W, Vattem D A, Maitin V, et al. Bioassays of quorum sensing compounds using *Agrobacterium tumefaciens* and *Chromobacterium violaceum* [M]. Quorum Sensing. Humana Press, 2011: 3-19
- [13] Vattem D A, Mihalik K, Crixell S H, et al. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors [J]. Fitoterapia, 2007, 78(4): 302-310
- [14] 刘尊英,郭红,朱素芹,等.凡纳滨对虾优势腐败菌鉴定及其群体感应现象[J].微生物学通报,2011,38(12):1807-1812  
LIU Zun-Ying, GUO Hong, ZHU Su-Qin, et al. Identification and quorum sensing of dominant spoilage bacteria from *Litopenaeus vannamei* [J]. Microbiology China, 2011, 38(12): 1807-1812
- [15] Yunos N Y M, Tan W S, Koh C L, et al. *Pseudomonas cremoricolorata* strain ND07 produces N-acyl homoserine lactones as quorum sensing molecules [J]. Sensors, 2014, 14(7): 11595-11604
- [16] Zhu J, Beaber J W, Moré M I, et al. Analogs of the autoinducer 3-oxooctanoyl-homoserine lactone strongly inhibit activity of the TraR protein of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(20): 5398-5405
- [17] 储卫华,刘永旺,朱卫.群体感应信号分子及其抑制剂快速检测方法的建立[J].生物技术通报,2011,3:34  
CHU Wei-hua, LIU Yong-wang, ZHU Wei. Rapid detection of quorum sensing signal molecules n-acylhomoserine lactones and its inhibitors [J]. Biotechnology Bulletin, 2011, 3: 34
- [18] 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  
SUN 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
- [19] 綦国红,董明盛,陈晓红,等.食源假单胞菌群体感应信号分子的研究[J].微生物学通报,2007,34(1):72-76  
QI Guo-hong, DONG Ming-sheng, CHEN Xiao-hong, et al. Research on quorum sensing signal molecules of *Pseudomonas spp.* isolated from food [J]. Microbiology China, 2007, 34(1): 72-76
- [20] McLean R J C, Pierson L S, Fuqua C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 58(3): 351-360
- [21] Ma L, Wang J, Wang S, et al. Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is posttranscriptionally regulated [J]. Environmental Microbiology 2012, 14(8): 1995-2005
- [22] 刘琳,谭小娟,贾爱群.细菌群体感应与细菌生物被膜形成之间的关系[J].微生物学报,2012,52(3):271-278  
LIU Lin, TAN Xiao-juan, JIA Ai-qun. Relationship between bacterial quorum sensing and biofilm formation [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52 (3): 271-278
- [23] Jack R F, Ringelberg D B, White D C. Differential corrosion rates of carbon steel by combinations of *Bacillus sp.*, *Hafnia alvei* and *Desulfovibrio gigas* established by phospholipid analysis of electrode biofilm [J]. Corrosion Science, 1992, 33(12): 1843-1853
- [24] Pumbwe L, Skilbeck C A, Wexler H M. Presence of quorum-sensing systems associated with multidrug resistance and biofilm formation in *Bacteroides fragilis* [J]. Microbial Ecology, 2008, 56(3): 412-419
- [25] Yunos N Y M, Tan W S, Koh C L, et al. *Pseudomonas cremoricolorata* strain ND07 produces N-acyl homoserine lactones as quorum sensing molecules [J]. Sensors, 2014, 14(7): 11595-11604