

# 外源硫化氢对氧化应激下铜绿假单胞菌生长和生物膜的调节作用

董晶晶, 蒋秀婷, 偶德馨, 邹艳艳, 叶应旺\*

(合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230000)

**摘要:** 探究外源硫化氢 ( $H_2S$ ) 对铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PAO1) 在氧化应激 ( $H_2O_2$ ) 胁迫条件下的作用。选取硫化钠 (NaHS) 作为外源  $H_2S$  的供体。将铜绿假单胞菌分为两组; 对照组的培养基中不添加 NaHS; 实验组的培养基中添加 0.2 mmol/L NaHS; 观察两组菌株在 0、1、2、2.5 mmol/L  $H_2O_2$  的压力下存活率、细胞形态、DNA 外渗量、生物膜生长的变化情况。研究表明, 随着时间的推移(从 0.5 h 到 1 h 再到 1.5 h), 与对照组菌株相比, 实验组菌株的存活率显著降低 ( $p < 0.05$ ), 其中在 1 mmol/L  $H_2O_2$  的处理下, 实验组比对照组显著降低 24.83%、15.69%、11.36%; 在 2 mmol/L  $H_2O_2$  的处理下, 实验组比对照组显著降低 4.92%、11.16%、5.75%; 在 2.5 mmol/L  $H_2O_2$  的处理下, 实验组比对照组降低 6.83%、2.98%、0.39%。实验组较对照组相比, 细胞形态受损和 DNA 外渗更加严重。利用结晶紫染色、扫描电子显微镜和激光共聚焦显微镜检测在不同浓度  $H_2O_2$  胁迫下生物膜形成的变化, 结果表明, 与对照组菌株的生物膜相比, 在含有 1 mmol/L 和 2 mmol/L  $H_2O_2$  的 Luria Bertani (LB) 培养基中实验组菌株的生物膜形成在培养 48 h 和 72 h 后显著减少。结果表明,  $H_2S$  能增强  $H_2O_2$  对铜绿假单胞菌细胞的损伤。

**关键词:** 铜绿假单胞菌; 外源硫化氢; 细菌形态; 生物膜

文章编号: 1673-9078(2022)01-81-87

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.1329

## Regulation of Growth and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* by Exogenous Hydrogen Sulfide under Oxidative Stress

DONG Jingjing, JIANG Xiuting, OU Dexin, ZOU Yanyan, YE Yingwang\*

(College of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230000, China)

**Abstract:** The effect of exogenous hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) on *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) growth under hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )-induced oxidative stress conditions was investigated using sodium sulfide hydride (NaHS) as the exogenous  $H_2S$ -releasing agent. Two groups of *Pseudomonas aeruginosa* were grown: a control and an experimental group with no NaHS and with 0.2 mmol/L NaHS added to the medium, respectively. The survival rate, cell morphology, DNA extravasation volume, and biofilm growth of the strain in both groups were observed under the oxidative stress induced by 0, 1, 2, and 2.5 mmol/L  $H_2O_2$ . The results showed that with the passage of time (i.e., from 0.5 h to 1 h through to 1.5 h), the survival rate of the cells in the experimental group was significantly lower than that in the control group ( $p < 0.05$ ); i.e., at 0.5, 1, and 1.5 h, the survival rates of the experimental group were reduced by 24.83%, 15.69%, and 11.36%, respectively, under 1 mmol/L  $H_2O_2$  treatment; by 4.92%, 11.16%, and 5.75%, respectively, under 2 mmol/L  $H_2O_2$  treatment; and by 6.83%, 2.98%, and 0.39%, respectively, under 2.5 mmol/L  $H_2O_2$  treatment, relative to those of the control group. The experimental group demonstrated more severe cell morphology damage and DNA extravasation than the control group did. Variations in biofilm formation under different  $H_2O_2$ -induced stress conditions were examined using crystal violet staining, scanning electron microscopy, and confocal laser scanning microscopy. The results

引文格式:

董晶晶, 蒋秀婷, 偶德馨, 等. 外源硫化氢对氧化应激下铜绿假单胞菌生长和生物膜的调节作用[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 81-87, +410

DONG Jingjing, JIANG Xiuting, OU Dexin, et al. Regulation of growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* by exogenous hydrogen sulfide under oxidative stress [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 81-87, +410

收稿日期: 2021-11-26

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFC101202)

作者简介: 董晶晶 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全, Email: dongjingjing0520@163.com

通讯作者: 叶应旺 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食源性致病微生物检测与控制, E-mail: yeyingwang04@126.com

showed a significant reduction in biofilm formation by the experimental group compared with that by the control group after 48 and 72 h of culture in Luria-Bertani medium containing 1 or 2 mmol/L  $H_2O_2$ . These results suggest that  $H_2S$  enhances  $H_2O_2$ -induced PAO1 cell damage in this bacterial strain.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*; exogenous hydrogen sulfide; bacterial morphology; biofilm

铜绿假单胞菌是一种革兰氏阴性细菌，常见于饮用水、土壤、医疗器械表面，甚至动物、植物和其他生物的组织中<sup>[1-3]</sup>。在过去的 100 年中，铜绿假单胞菌已进化为最重要的人类病原体之一<sup>[4]</sup>。铜绿假单胞菌在呼吸道感染性疾病中最为常见，是引起呼吸相关肺炎和医院感染的重要病原体<sup>[5]</sup>，在患有代谢疾病、血液病、恶性肿瘤和术后感染的患者中是高度敏感的原体。在目前已知的病原菌中，铜绿假单胞菌的基因组最大，调节基因最多，耐药机制异常复杂<sup>[6]</sup>。

$H_2S$  是继一氧化氮 (NO) 和一氧化碳 (CO) 之后发现的第三种气体信号分子<sup>[7]</sup>，能够调节许多生理和病理过程，并与生物系统中的各种疾病相关<sup>[8,9]</sup>。虽然  $H_2S$  已经被人们认识了几个世纪，但它在细菌生理学中的作用仍是一个新的知识<sup>[10]</sup>。目前的研究表明  $H_2S$  既有保护细菌免受氧化应激的作用，又有杀死细菌的功能<sup>[11]</sup>。Shatalin 等人<sup>[12]</sup>于 2011 年提出  $H_2S$  作为细菌对抗生素的一般防御机制：内源性  $H_2S$  通过干扰 Fenton 反应和刺激活性氧 (ROS) 清除酶来减少 ROS 的形成，从而促进抗生素耐药性。这种机制适用于金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌和炭疽杆菌。然而，长期以来， $H_2S$  也被认为是有毒的，作为一种生长抑制分子，破坏 DNA、破坏二硫键交联使蛋白质变性、与辅基结合使金属酶的氧化还原中心失活，并增强氧化应激<sup>[13]</sup>。最近， $H_2S$  已被证明对某些微生物具有细胞毒性作用<sup>[14-17]</sup>，Renieris 等人<sup>[18]</sup>强调宿主衍生的  $H_2S$  是对抗铜绿假单胞菌感染的一种新的保护机制：通过增强中性粒细胞的吞噬活性，以及抑制铜绿假单胞菌的细胞间通讯系统 (QS 系统)，使其更容易被吞噬掉，从而保护宿主健康。付榴辉等人<sup>[19]</sup>表明  $H_2S$  通过氧化损伤对大肠杆菌具有抗菌作用。

在本研究中，尝试了解外源性  $H_2S$  对氧化应激条件下铜绿假单胞菌的影响。通过存活率、细菌形态和生物膜的相关实验，发现  $H_2S$  会加剧  $H_2O_2$  对铜绿假单胞菌的杀伤作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

#### 1.1.1 实验材料

菌株：铜绿假单胞菌的野生型菌株 (WT) 购于

广东省微生物培养中心。

主要试剂：Luria-Bertani (LB) 肉汤培养基、平板计数培养基 (PCA)，北京奥博星生物技术有限责任公司；溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基，青岛海博生物；0.9% 氯化钠注射液 (生理盐水)，江苏科伦药业有限公司；磷钨酸，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；丙三醇 (分析纯)、无水乙醇、结晶紫，国药集团化学试剂有限公司；伴刀豆球蛋白 A (FITC-Con A)、PI 染料，美国 sigma-aldrich 公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

DW-86L416G -80 °C 低温保存箱，青岛海尔生物医疗股份有限公司；SHP-80 生化培养箱，上海培因实验仪器有限公司；JMY-100C 恒温摇床，上海久茂仪表有限公司；Infinite 200 Pro 酶标仪，瑞士 TECAN 公司；JEM-1400flash LaB6 透射电子显微镜，日本 JEOL 公司；热场发射扫描电子显微镜，德国卡尔蔡司；FV1000 激光共聚焦扫描显微镜，日本 OLYMPUS 公司。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 细菌生长曲线的测定

吸取 -80 °C 保存的野生型菌株 PAO1 于 5 mL 无菌 LB 肉汤培养基中过夜培养，在溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板上三区划线进行分离纯化，然后将培养皿倒置于 37 °C 恒温培养箱中培养；从隔夜培养的溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基平板上挑取单个菌落于 5 mL 无菌 LB 管中，在 37 °C、180 r/min 下培养 18 h 以获得种子溶液；按 1% 的接种量将种子溶液接种至 5 mL 无菌 LB 和 5 mL 加入 0.2 mmol/L NaHS 的无菌 LB 中。然后，分别吸取 200  $\mu$ L 培养物添加到 96 孔板中，每隔两小时测量并纪录 600 nm 处的光密度 (OD) 吸光值。

### 1.2.2 存活率

将菌株在 LB 和含有 0.2 mmol/L NaHS 的 LB 中培养，然后分别在 0、1、2 和 2.5 mmol/L 下进行  $H_2O_2$  压力处理，在 37 °C、200 r/min 下摇晃 0.5 h、1 h 和 1.5 h。到达相应时间点后，用无菌生理盐水梯度稀释细菌溶液，然后在平板计数琼脂培养基 (PCA) 温度大约 50 °C 时通过倾注倒平板。培养皿倒置在 37 °C 恒温培养箱中培养 16 h~18 h。使用菌落计数法进行计

数。每组实验均进行三次。存活率(%)=(不同浓度 $H_2O_2$ 下的菌落数/未经 $H_2O_2$ 处理下的菌落数) $\times 100\%$ 。

### 1.2.3 透射电子显微镜测细菌形态

将菌株分别培养在 LB 和含有 0.2 mmol/L NaHS 的 LB 中,然后在 0、1、2 和 2.5 mmol/L 下进行 $H_2O_2$ 压力处理 1 h。使用透射电子显微镜评估细菌细胞形态。操作步骤严格按照 Wang 等人<sup>[20]</sup>的描述执行。

### 1.2.4 DAPI 染色观察 DNA

将菌株分别培养在 LB 和含有 0.2 mmol/L NaHS 的 LB 中,然后在 0、1、2 和 2.5 mmol/L 下进行 $H_2O_2$ 压力处理 1 h。无菌 PBS 清洗 3 次后收集沉淀。向沉淀中加入 4%的多聚甲醛固定 10 min,之后将沉淀重新悬浮于 1 mL 的无菌 PBS 中。将 500  $\mu$ L 的 DAPI(10  $\mu$ g/mL)染料和 500  $\mu$ L 的菌液混合于黑暗中静置 10 min。再用无菌 PBS 离心洗涤样品 3 次以防止 DAPI 残留。样品重新悬浮于无菌 PBS 中,滴加 5  $\mu$ L 样品于无菌载玻片上涂抹均匀,在激光共聚焦显微镜下进行观察。

### 1.2.5 生物膜

#### 1.2.5.1 结晶紫

隔夜培养的细菌分别用 LB 肉汤培养基和含有 0.2 mmol/L NaHS 的 LB 肉汤培养基稀释至最终浓度 $1\times 10^6\sim 2\times 10^6$  CFU/mL。将稀释的菌液(2  $\mu$ L)分别添加到 198  $\mu$ L 无菌 LB 肉汤和含有 1、2 和 2.5 mmol/L  $H_2O_2$  无菌 LB 肉汤的 96 孔板中。在培养到 24 h、48 h 和 72 h 后,小心地移除培养基,并用无菌水冲洗三次,以去除自由漂浮的细菌;在室温下干燥 1 h;用浓度为 1%结晶紫对孔中的粘附细菌进行 30 min 的染色;用无菌水冲洗三次以去除多余的染剂。最后用 33%的乙酸培养 15 min,使结晶紫释放。用酶标仪测量每个孔在 570 nm 处的 OD 值。每组实验均进行三次。

#### 1.2.5.2 扫描电子显微镜

将细胞爬片放入分别含有 1.98 mL LB、LB+1 mmol/L  $H_2O_2$ 、LB+2 mmol/L  $H_2O_2$  和 LB+2.5 mmol/L  $H_2O_2$  的 24 孔板中。然后,吸取 20  $\mu$ L 铜绿假单胞菌过夜培养物加入上述 24 孔板中,并将菌液与含有不同浓度  $H_2O_2$  的 LB 培养基混合,将孔板放置在 37  $^{\circ}$ C 生化培养箱里培养 24、48 和 72 h。在  $H_2O_2$  激发之前添加 0.2 mmol/L NaHS 作为实验组。在生物膜形成期间,每隔 24 h 用新鲜培养基替换旧培养基。培养至相应时间的细胞爬片用 PBS 清洗以去除浮游细胞,之后浸在 1 mL 2.5%戊二醛中固定,在 4  $^{\circ}$ C 下固定 24 h 后,细胞爬片用 50%、70%、80%、90%和 100%的乙醇脱水(每种浓度 30 min),经过冷冻干燥、镀金处理后,样品制作完成,最后用扫描电子显微镜进行检测观察。

### 1.2.5.3 激光共聚焦显微镜

使用激光共聚焦显微镜可以检测生物膜的存在。以与扫描电子显微镜检测相同的方式制备细胞爬片。当细胞爬片在 37  $^{\circ}$ C 下培养 24、48 和 72 h 后,用 FITC-Con A 及 PI 染剂对细胞爬片上形成的细菌生物膜进行染色,然后通过 CLSM 进行观察。

## 2 结果与讨论

### 2.1 0.2 mmol/L NaHS 对铜绿假单胞菌生长状态的影响

图 1a 为空白组菌株(未添加硫化氢)和实验组菌株(添加 0.2 mmol/L NaHS)在 OD<sub>600</sub> 下的生长曲线对照。一般来说,低浓度的  $H_2S$  具有细胞保护作用,高浓度的  $H_2S$  对微生物具有细胞毒性<sup>[12,21]</sup>。高浓度的硫化物通过抑制超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性,阻碍大肠杆菌、黑曲霉、意大利青霉菌和鲍曼不动杆菌等细菌的生长以及与细胞防御氧化应激相关的天冬氨酸酶<sup>[17,19]</sup>。如图 1a 所示,0.2 mmol/L NaHS 对铜绿假单胞菌的生长状态没有显著影响。因此,可以更好地比较两组菌株在氧化应激下的情况。

### 2.2 氧化应激条件下 NaHS 对铜绿假单胞菌存活率的影响

图 1b~d 为对照组菌株(未添加硫化氢)和实验组菌株(添加 0.2 mmol/L NaHS)在氧化应激下(0、1、2 和 2.5 mmol/L  $H_2O_2$ )的存活率比较。 $H_2O_2$  是最常用的氧化剂,可在细菌中产生各种 ROS,引起氧化应激并导致蛋白质、脂肪和 DNA 的损伤<sup>[22]</sup>,并且在某些条件下,对细菌细胞造成致命的杀伤<sup>[23-24]</sup>。如图 1b~d 所示,细菌的存活率随着时间的推移而降低;随着  $H_2O_2$  浓度的增加,铜绿假单胞菌的存活率显著降低( $p<0.01$ ):在处理时间分别为 0.5、1 和 1.5 h 时,当  $H_2O_2$  浓度为 1 mmol/L 和 2 mmol/L 时,实验组的存活率均显著低于对照组( $p<0.01$ );当时间为 1.5 h,  $H_2O_2$  浓度为 2.5 mmol/L 时,对照组和实验组的存活率极低且无明显的差异,有可能是长时间,高浓度的  $H_2O_2$  对细菌造成的氧化损伤过大,以致 NaHS 的存在对细菌的影响减少。特别值得注意的是,在各个时间段,实验组的存活率均显著低于对照组。与前人的实验结果类似<sup>[19]</sup>,因此可以认为  $H_2S$  会加剧  $H_2O_2$  对铜绿假单胞菌的杀伤作用。

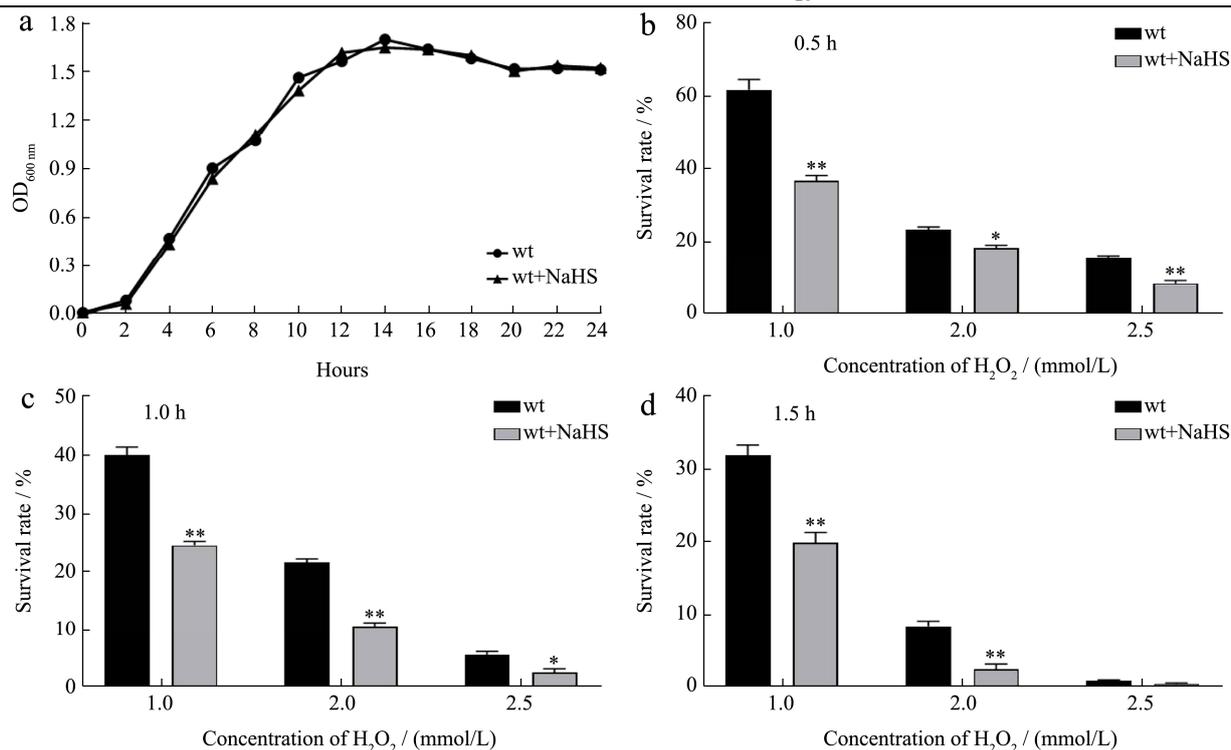


图1 铜绿假单胞菌的生长曲线和存活率

Fig.1 Growth curve and survival rate of *Pseudomonas aeruginosa*

注: \*表示  $p < 0.05$ , \*\*表示  $p < 0.01$ 。

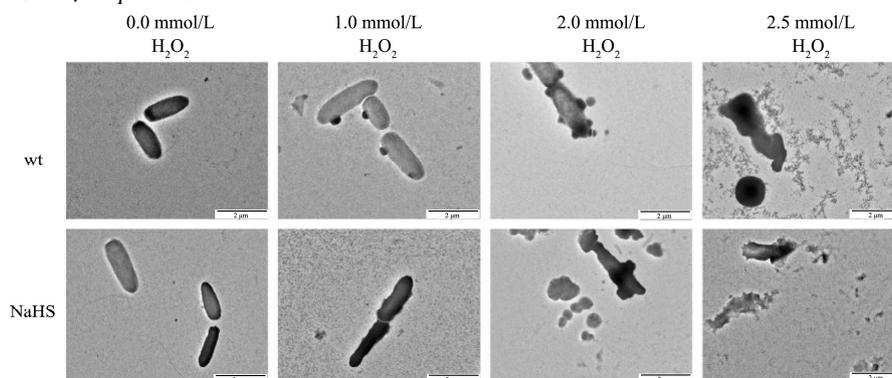


图2 氧化应激下 0.2 mmol/L NaHS 对铜绿假单胞菌形态的影响

Fig.2 Effect of 0.2 mmol/L NaHS on the morphology of *Pseudomonas aeruginosa* under oxidative stress

### 2.3 氧化应激条件下 NaHS 对铜绿假单胞菌细胞形态的影响

图2为对照组菌株(未添加硫化氢)和实验组菌株(添加0.2 mmol/L NaHS)在氧化应激下(0、1、2和2.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的细胞形态比较。在没有氧化应激的情况下,两组菌株的细胞没有显著差异,菌体细胞结构完整,均呈杆状,表面光滑,一端有鞭毛。随着H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的增加,两组菌株形态的改变逐渐加重,而且实验组比对照组更严重。当H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为1 mmol/L时,细菌皱缩,鞭毛消失,细胞表面聚集着颗粒状物质,这可能是无机多磷酸盐(polyP)<sup>[25]</sup>。polyP是具

有氧化应激能力的生物聚合物,能够防止氧化损伤、蛋白聚集,通过螯合金属离子降低自由基浓度,以及调节不同细菌的一般应激反应途径来提高细菌的氧化应激能力<sup>[26]</sup>。当H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度为2 mmol/L甚至2.5 mmol/L时,细菌开始破裂,可以观察到胞质外流的现象。

### 2.4 氧化应激条件下 NaHS 对铜绿假单胞菌DNA的影响

DAPI是一种可以穿透细胞膜的蓝色荧光染料,和双链DNA结合后可以产生比DAPI自身强20多倍的荧光,且核酸量越大,荧光强度越强<sup>[27]</sup>。如图3所示,在没有过氧化氢的压力下,两组的荧光亮度无明显

显区别。随着过氧化氢的浓度越来越大，实验组的荧光强度明显弱于对照组，即与对照组相比实验组的核

酸含量要明显低，可能由于 NaHS 作用后铜绿假单胞菌细胞膜的通透性升高导致胞内核酸流失。

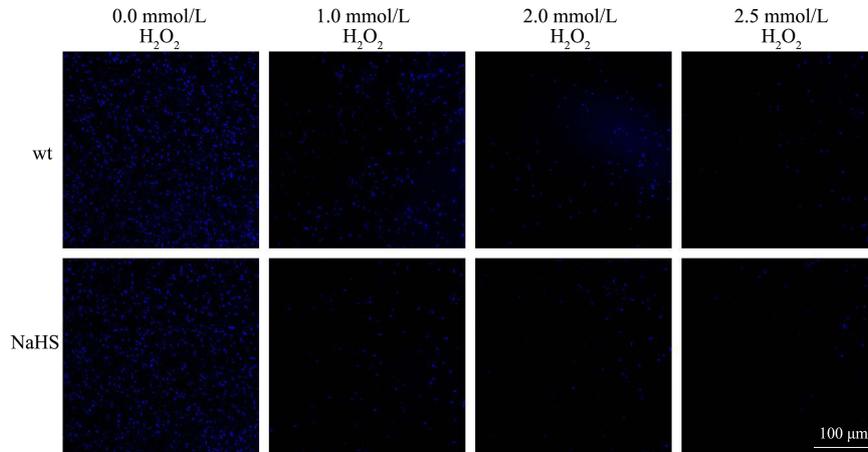


图3 氧化应激下 0.2 mmol/L NaHS 对铜绿假单胞菌 DNA 的影响

Fig.3 Effect of 0.2 mmol/L NaHS on the DNA of *Pseudomonas aeruginosa* under oxidative stress

### 2.5 氧化应激条件下 NaHS 对铜绿假单胞菌生物膜的影响

生物膜是由微生物在自产基质的保护下形成的，通常附着在表面。在食品加工环境中，生物膜通过腐败和致病菌的传播危及产品安全<sup>[28]</sup>。细菌生物膜过去 20 年中在治疗传染病方面认识到的一个新的临床问题。与对标准抗生素治疗反应相对较好的浮游细菌引起的感染相比，生物膜形成细菌往往会引起慢性感染<sup>[29]</sup>。Walsh 等<sup>[30]</sup>发现，二级过硫传感器 BigR 会影响生物膜相关基因的表达。

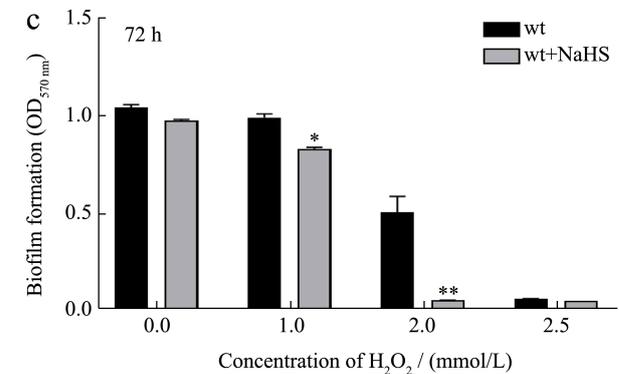
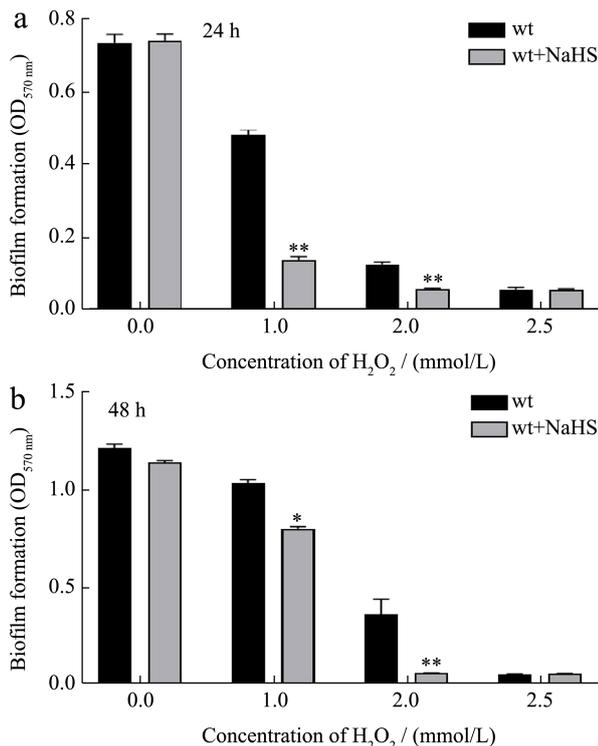


图4 氧化应激条件下 0.2 mmol/L NaHS 对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响 (结晶紫实验)

Fig.4 Effect of 0.2 mmol/L NaHS on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* under oxidative stress (crystalline violet experiment)

注: \*表示  $p < 0.05$ , \*\*表示  $p < 0.01$ 。

在结晶紫实验中，如图 4 所示，两种状态的菌株在 24 h 形成的生物膜量最少，在 48 h 达到最大生物膜量。在没有氧化应激的情况下，两组菌株的生物膜形成量相似。随着 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度增加到 1 mmol/L 和 2 mmol/L 时，生物膜形成显著减少，值得注意的是，实验组菌株的生物膜形成少于对照组菌株，由此推断 H<sub>2</sub>S 增强了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对铜绿假单胞菌的损伤。此外，可以看到 2.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对铜绿假单胞菌造成致命的伤害，几乎不能形成生物膜。细菌生物膜的形成涉及到从未成熟到成熟结构的转变，包括可逆粘附、不可逆粘附、微菌落形成、成熟和分散<sup>[31]</sup>。在本研究中，通过扫描电镜重点观察了铜绿假单胞菌在细胞爬片上形成的不同阶段。如图 5 所示，在培养 24 h 时，生物膜没有很好地形成，并且在细胞爬片上观察到许多浮游细菌。培养 48 h 后，观察到细菌聚集成一团，具有成

熟的空间结构。在培养 72 h 后,生物膜结构发生改变,生物膜分散。值得注意的是,随着  $H_2O_2$  浓度的逐渐升高,铜绿假单胞菌生物膜逐渐减少。在相同  $H_2O_2$  浓度下,与对照组相比,实验组的菌株形成的生物膜更少。在  $H_2O_2$  浓度为 2.5 mmol/L 时,菌株基本上没有形成生物膜,只有少数浮游细菌在细胞爬片上。激光共聚焦图像(如图 6 所示)显示生物膜的形成过程,在 24、48、72 h 的培养时间里,生物膜的厚度呈现先增加再减少的趋势,并且图片中红色代表的死菌数量逐渐增加。同时,随着  $H_2O_2$  浓度的增加,生物膜形成能力逐渐降低且死菌的数量相应增加。在 2.5 mmol/L  $H_2O_2$  的处理条件下,在各个时间点,几乎都

不形成生物膜,仅存少量散落的细菌。

### 3 结论

本实验以铜绿假单胞菌为研究对象,分别从存活率、细胞形态、生物膜等方面探讨外源硫化氢对氧化应激的作用。结果表明 0.2 mmol/L NaHS 能显著降低铜绿假单胞菌在氧化应激胁迫下的存活率和生物膜的形成,加重细胞形态的损伤和 DNA 的外渗。以上研究表明 0.2 mmol/L NaHS 能增强  $H_2O_2$  对铜绿假单胞菌的杀伤作用,为铜绿假单胞菌的防控提供新的思路。关于 NaHS 能增强  $H_2O_2$  对铜绿假单胞菌的杀伤作用的具体机制需要进行更进一步的研究。

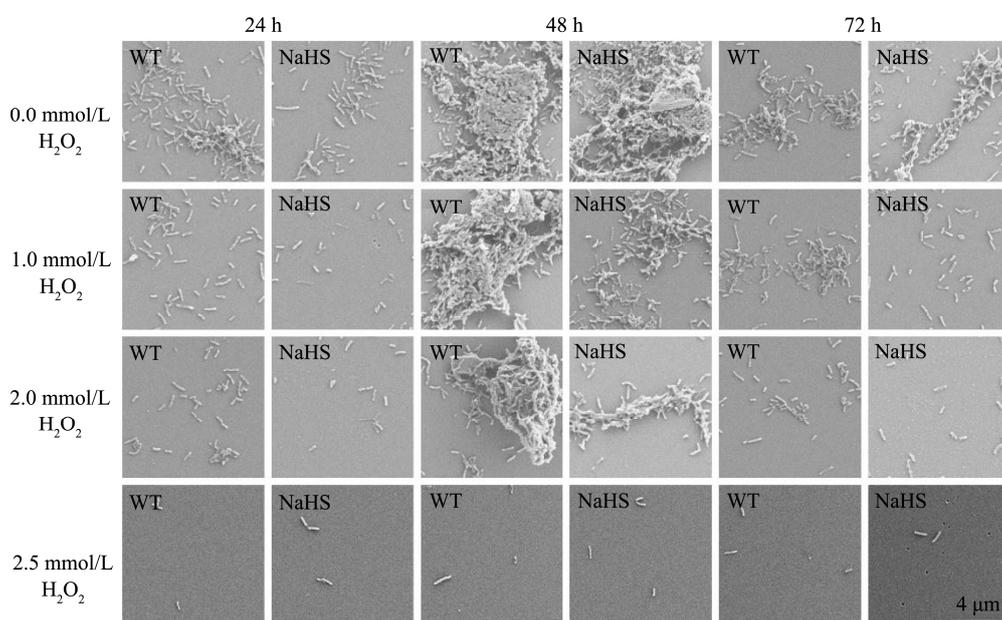


图 5 氧化应激条件下 0.2 mmol/L NaHS 对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响(扫描电子显微镜)

Fig.5 Effect of 0.2 mmol/L NaHS on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* under oxidative stress (SEM)

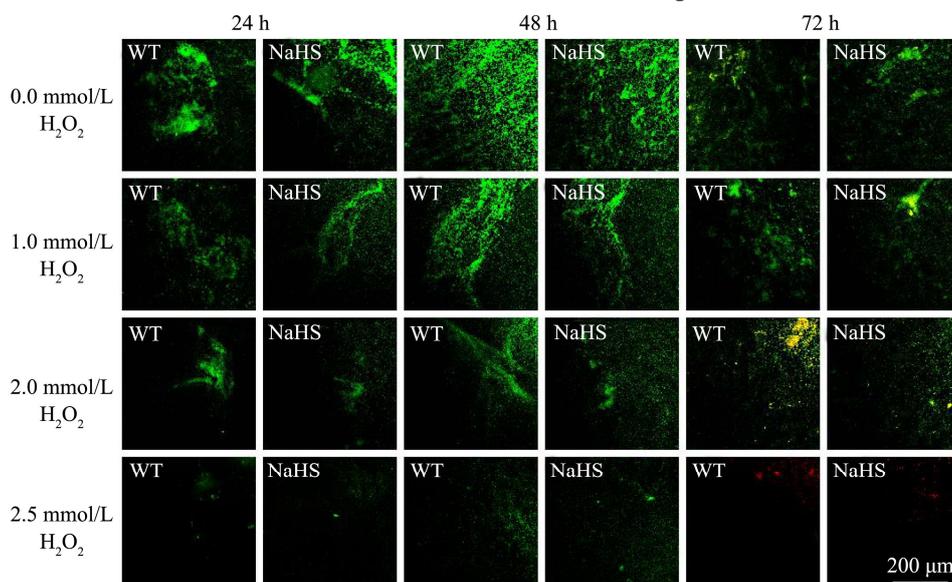


图 6 氧化应激条件下 0.2 mmol/L NaHS 对铜绿假单胞菌生物膜形成的影响(激光共聚焦)

Fig.6 Effect of 0.2 mmol/L NaHS on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* under oxidative stress (CLSM)

## 参考文献

- [1] Tielen P, Kuhn H, Rosenau F, et al. Interaction between extracellular lipase LipA and the polysaccharide alginate of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. BMC Microbiol, 2013, 13: 159
- [2] Yu H, Xiong J, Qiu J, et al. Type III secretion protein, PcrV, impairs *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by increasing M1 macrophage-mediated anti-bacterial activities [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1971
- [3] Yang Z S, Ma L Q, Zhu K, et al. *Pseudomonas* toxin pyocyanin triggers autophagy: Implications for pathoadaptive mutations [J]. Autophagy, 2016, 12(6): 1015-1028
- [4] Starkey M, Rahme L G. Modeling *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis in plant hosts [J]. Nat Protoc, 2009, 4(2): 117-124
- [5] Sawa T, Hamaoka S, Kinoshita M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU and its predicted homologs [J]. Toxins (Basel), 2016, 8(11): 307
- [6] Bucior I, Pielage J F, Engel J N. *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(4): e1002616
- [7] Zhang G Y, Lu D, Duan S F, et al. Hydrogen sulfide alleviates lipopolysaccharide-induced diaphragm dysfunction in rats by reducing apoptosis and inflammation through ROS/MAPK and TLR4/NF-kappaB signaling pathways [J]. Oxid Med Cell Longev, 2018: 9647809
- [8] Walsh B J C, Giedroc D P. H<sub>2</sub>S and reactive sulfur signaling at the host-bacterial pathogen interface [J]. J Biol Chem, 2020, 295(38): 13150-13168
- [9] Yang M, Fan J, Du J, et al. Small-molecule fluorescent probes for imaging gaseous signaling molecules: current progress and future implications [J]. Chem Sci, 2020, 11(20): 5127-5141
- [10] Bryan N S, Lefer D J. Update on gaseous signaling molecules nitric oxide and hydrogen sulfide: strategies to capture their functional activity for human therapeutics [J]. Mol Pharmacol, 2019, 96(1): 109-114
- [11] Wu G, Wan F, Fu H, et al. A matter of timing: contrasting effects of hydrogen sulfide on oxidative stress response in *Shewanella oneidensis* [J]. J Bacteriol, 2015, 197(22): 3563-3572
- [12] Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, et al. H<sub>2</sub>S: a universal defense against antibiotics in bacteria [J]. Science, 2011, 334(6058): 986-990
- [13] Aroca A, Gotor C, Bassham D C, et al. Hydrogen sulfide: from a toxic molecule to a key molecule of cell life [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(7): 621
- [14] Eghbal M A, Pennefather P S, O'Brien P J. H<sub>2</sub>S cytotoxicity mechanism involves reactive oxygen species formation and mitochondrial depolarisation [J]. Toxicology, 2004, 203(1-3): 69-76
- [15] Caro A A, Thompson S, Tackett J. Increased oxidative stress and cytotoxicity by hydrogen sulfide in HepG2 cells overexpressing cytochrome P450 2E1 [J]. Cell Biol Toxicol, 2011, 27(6): 439-453
- [16] Mirzoyan N, Schreier H J. Effect of sulfide on growth of marine bacteria [J]. Arch Microbiol, 2014, 196(4): 279-287
- [17] Fu L H, Hu K D, Hu L Y, et al. An antifungal role of hydrogen sulfide on the postharvest pathogens *Aspergillus niger* and *Penicillium italicum* [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104206
- [18] Renieris G, Droggiti D E, Katrini K, et al. Host cystathionine-gamma lyase derived hydrogen sulfide protects against *Pseudomonas aeruginosa* sepsis [J]. PLoS Pathog, 2021, 17(3): e1009473
- [19] Fu L H, Wei Z Z, Hu K D, et al. Hydrogen sulfide inhibits the growth of *Escherichia coli* through oxidative damage [J]. J Microbiol, 2018, 56(4): 238-245
- [20] Wang C Y, Hsu C P, Huang H W, et al. The relationship between inactivation and morphological damage of *Salmonella enterica* treated by high hydrostatic pressure [J]. Food Research International, 2013, 54(2): 1482-1487
- [21] Ritter J M. Human pharmacology of hydrogen sulfide, putative gaseous mediator [J]. Br J Clin Pharmacol, 2010, 69(6): 573-575
- [22] Arcanjo N O, Andrade M J, Padilla P, et al. Resveratrol protects *Lactobacillus reuteri* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - induced oxidative stress and stimulates antioxidant defenses through upregulation of the dhaT gene [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 135: 38-45
- [23] Zhao X, Drlica K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress [J]. Curr Opin Microbiol, 2014, 21: 1-6
- [24] Imlay J A. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think [J]. Curr Opin Microbiol, 2015, 24: 124-131

(下转第 410 页)