

拮抗铜绿假单胞菌的乳酸菌筛选及机制研究

Screening of lactic acid bacteria against *Pseudomonas aeruginosa* and preliminary study on its mechanism

李建周^{1,2,3,4}肖尧婷³李红霄²陈晓华^{2,3,4}李安平¹LI Jian-zhou^{1,2,3,4} XIAO Yao-ting³ LI Hong-xiao² CHEN Xiao-hua^{2,3,4} LI An-ping¹

(1. 中南林业科技大学食品学院, 湖南 长沙 410004; 2. 衡阳师范学院南岳学院,

湖南 衡阳 421002; 3. 衡阳师范学院生命科学与环境学院, 湖南 衡阳 421008;

4. 衡阳师范学院南岳山区生物资源保护与利用湖南省重点实验室, 湖南 衡阳 421008)

(1. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology,

Changsha, Hunan 410004, China; 2. College of Life Sciences and Environment, Hengyang Normal

University, Hengyang, Hunan 421008, China; 3. Nanyue College of Hengyang Normal University,

Hengyang, Hunan 421002, China; 4. Hunan Key Laboratory for Conservation and Utilization of Biological Resources of Nanyue Mountainous Region, Hengyang Normal University, Hengyang, Hunan 421008, China)

摘要:目的:以铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)为指示菌,基于群体感应系统筛选拮抗 PA 作用的乳酸菌(*Lactic acid bacteria*, LAB)并探讨拮抗机制。方法:通过牛津杯法筛选抑制 PA 生长的 LAB,测定 LAB 的 AI-2 表达量,LAB 抑制 PA 生物膜形成力、绿脓菌素表达量及 LAB 无菌上清液与 PA 共培养时 AI-2 信号分子的表达量,并利用皮尔森相关性分析探讨 LAB 拮抗 PA 机制。结果:格氏乳杆菌 LGchen 和唾液乳杆菌 S-5-6 的整体抗菌效果比较强,抑菌圈达到 20 mm 以上,AI-2 相对荧光值达到 1.2 以上,抑制 PA 的绿脓菌素表达率达 50% 以上,抑制 PA 生物膜形成率达 70% 左右。LAB 抑制 PA 生长的能力与 LAB 的表达 AI-2 的能力、抑制 PA 的生物膜形成能力呈正相关,与 PA 的绿脓菌素表达呈负相关。结论:LAB 可以通过提高 AI-2 表达,抑制 PA 生物膜形成和绿脓菌素表达来抑制 PA 的生长。

关键词:乳酸菌;铜绿假单胞菌;群体感应;自诱导分子 AI-2

基金项目:湖南省自然科学基金(编号:2019JJ50014);国家自然科学基金青年基金(编号:31601444);衡阳师范学院大学生创新创业训练计划项目(编号:cxcy1934);衡阳师范学院大学生课外学术科技作品竞赛(编号:校科学[2019]2号)

作者简介:李建周,男,中南林业科技大学在读博士研究生。

通信作者:陈晓华(1981—),女,衡阳师范学院副教授,博士。

E-mail: chxh0217@163.com

李安平(1967—),男,中南林业科技大学教授,博士。

E-mail: 912336799@qq.com

收稿日期:2021-04-09

Abstract: Objective: In this study, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) was used as the indicator bacteria, and based on the quorum sensing system, the lactic acid bacteria (LAB) that antagonized the effect of PA were screened and the antagonistic mechanism was preliminarily discussed. **Methods:** The mechanism of LAB antagonizing PA was explored by the tests of Oxford Cup Method screening LAB to inhibit the growth of PA, AI-2 expression of LAB, biofilm formation ability of PA, pyocyanin expression and the AI-2 expression of PA with LAB sterile supernatants, and the analysis of Pearson correlation. **Results:** The results showed that *Lactobacillus gasseri* LGchen and *Lactobacillus salivarius* S-5-6 have stronger abilities of antagonizing PA growth. The inhibition zone was more than 20 mm, and the relative fluorescence value of AI-2 was more than 1.2, and the inhibition rate of PA pyocyanin expression was above 50%, and the inhibition rate of PA biofilm formation was about 70%. The ability of LAB to inhibit the growth of PA was positively correlated with the ability of LAB to express AI-2 and the inhibition biofilm formation ability of PA, and this was negatively correlated with the pyocyanin expression of PA. **Conclusion:** LAB can inhibit the growth of PA by increasing the expression of AI-2, inhibiting PA biofilm formation and pyocyanin expression.

Keywords: lactic acid bacteria; *Pseudomonas aeruginosa*; quorum sensing; autoinducer-2(AI-2)

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)又称绿脓杆菌,是典型的条件致病菌^[1],同时也是重要的食源性致病菌,其产生的毒力因子可引起食物中毒和饮用水的

污染,导致患者产生头晕、呕吐和腹泻等症状^[2-3]。由于 PA 具有内源性、获得性和适应性多重耐药机制,常导致多重耐药性 PA 菌株的出现和抗生素治疗的失败^[4]。2017 年世界卫生组织将耐碳青霉烯的 PA 列为迫切需要开发新抗菌药物治疗的细菌之一。因此,开发新的抗菌药物和寻找天然具有抗菌作用的替代物是临床 PA 治疗的理想选择。

乳酸菌(*Lactic acid bacteria*, LAB)是一类对人体有益的重要微生物,被公认为是安全的食品级微生物。LAB 在自然界中广泛存在,土壤、食品以及人体、畜禽肠道内均含有 LAB。LAB 代谢过程中产生的有机酸抗菌肽,可抑制病原微生物生长繁殖、调节肠道微生物菌群平衡,从而对宿主的营养状态、生理功能、应激反应等产生作用。目前临床中许多益生 LAB 已被用来预防或治疗各种胃肠疾病,包括感染性腹泻、新生儿肠炎、慢性结肠炎、肠易激综合征和炎症性肠病^[5]。

微生物通过群体感应系统(QS)协调群体行为,其中存在多种 QS 系统,革兰氏 G⁺和革兰氏 G⁻中都存在的自诱导物 AI-2,是不同种属细菌间通讯交流的通用信号分子。AI-2 是一种呋喃酮类化合物,为对称的双五圆环结构的呋喃酮酰肼酸二酯,是甲硫氨酸循环通路——甲基循环的一个副产品。目前已知 70 多个种属的细菌基因组中含有 *luxS* 的同源序列,并且 AI-2 的生物合成途径基本相似。微生物菌群中 AI-2 信号分子的表达受 AI-2/LuxS QS 系统调控,且参与 QS 的 *luxS* 基因可调控 LAB 的生理活性^[6],LAB 的抑菌机制与 AI-2/LuxS 的表达系统有关^[7-8]。QS 系统可以调控 LAB 的多项重要生理功能,如调控菌体生物膜的形成^[9]、胞外酶的合成^[10]、抗菌肽的合成^[11]、肠道定殖能力^[12]等。Park 等^[13]发现从泡菜中筛选出的清酒乳杆菌(*Lactobacillus sakei*) NR28 对大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*) ATCC43894 的 AI-2 具有淬灭作用,能达到降低致病性的目的。陈小春等^[14]研究发现太平洋杆菌可通过抑制 PA 的 QS 系统降低 PA 毒力因子的表达。Rana 等^[15]利用 LAB(乳酸乳球菌、发酵乳杆菌和鼠李糖乳杆菌)上清液抑制 PAO1 信号分子 AHL 的表达,从而抑制弹性蛋白酶活性,降低 PA 生物膜的形成。Chappell 等^[16]通过构建乳杆菌工程菌,表达降解 PA 生物膜的酶,抑制 PA 生物膜的形成。综上,LAB 有抑制 PA 的作用,但 LAB 抑制 PA 的作用机制尚未明晰。

研究拟筛选抑制 PA 的 LAB,通过测定 LAB 群体感应信号分子 AI-2 的表达,LAB 抑制 PA 生物膜形成、绿脓菌素(PYO)表达及 LAB 无菌上清液与 PA 共培养时 AI-2 信号分子的表达探讨 LAB 拮抗 PA 的机制。旨在为乳杆菌拮抗 PA 的机制研究提供新的思路,也为乳杆菌益生特性的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

12 株 LAB(其中 6 株来源于泡菜,2 株来源于腐乳,2 株来源于鸡粪便,1 株来源于发酵米,1 株来源于酸奶)、铜绿假单胞菌(PAO1)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi* BB170, BB152)大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 α);实验室保存菌株;

LAB 培养用 MRS 培养基、AO1 用 LB 培养基、BB170 和 BB152 用海生培养基、DH5 α 用 LB 培养基;青岛海博生物技术有限公司。

1.2 菌株的培养及上清液制备

LAB 按体积分数 2%接种于 MRS 培养基中,37 °C 活化 3 代,继续培养 18 h;PAO1 按体积分数 1%接种于 LB 培养基,37 °C 活化 3 代,继续培养 18 h;BB170、BB152 按体积分数 2%接种于 AB 培养基中,30 °C 活化 3 代,继续培养 12 h;DH5 α 按体积分数 1%接种于 LB 培养基中,30 °C 活化 3 代,继续培养 18 h。以上菌株获得培养液后,6 000 r/min 离心 10 min,上清液用 0.22 μ m 过滤器过滤,获得试验菌株的无菌上清液,于-80 °C 超低温冰箱保存备用。

1.3 共培养物上清液的制备

将 LAB 上清液、MRS 培养基上清液、DH5 α 上清液以及 LB 培养基上清液分别按 $V_{\text{上清液}} : V_{\text{PA菌液}} = 1 : 1$ 分别接入浓度为 10^6 CFU/mL 的 PA 菌液中,培养 24 h,6 000 r/min 离心 10 min,上清液用 0.22 μ m 滤菌器过滤,得到无菌共培养上清液,于-80 °C 超低温冰箱保存备用。

1.4 LAB 抑菌能力测定

参照 Chappell 等^[16]的方法并稍作修改。将质量分数 2%琼脂灭菌后倒入平板中,凝固后放入 4 个无菌牛津杯,倒入浓度约为 10^6 CFU/mL 的 PA 菌液,待凝固后,用镊子夹出。取 200 μ L LAB 上清液加入到牛津杯孔中,37 °C 培养 24 h,测定抑菌圈直径。每个样品做 3 个平行,重复 3 次。以 MRS 培养基(pH 4.0)作为空白对照。抑菌圈直径>15 mm 判定为高度敏感;抑菌圈直径为 11~15 mm 判定为中度敏感;抑菌圈直径为 5~10 mm 判定为低度敏感;抑菌圈直径为 4 mm 判定为不敏感^[17]。

1.5 信号分子 AI-2 的检测

参照蔡针华等^[18]的方法稍作修改。将 BB170 按体积分数 2%接种于海生培养基,30 °C 培养 12 h,至菌体 OD_{600 nm} 为 0.8~1.2,用新鲜的 AB 培养基以 1 : 100 稀释 BB170 培养液,充分震荡混匀后备用。将 LAB 上清液、BB152 无菌上清液、DH5 α 无菌上清液和 BB170 培养液分别作为待测样品、阳性对照、阴性对照和介质对照,各 4 个平行。按体积比 1 : 100 与稀释后的 BB 170 培养液混合培养 3.5 h,测定化学发光值。用相对荧光强度

表示信号分子 AI-2 的强度,分别按式(1)和式(2)进行计算。

$$N_{AI-2} = \frac{F_{1,1}}{F_{1,2}}, \quad (1)$$

$$T_{AI-2} = \frac{F_{1,3}}{F_{1,4}}, \quad (2)$$

式中:

N_{AI-2} ——阴性对照组相对荧光强度;

$F_{1,1}$ ——阴性对照组荧光强度;

$F_{1,2}$ ——阳性对照组荧光强度;

T_{AI-2} ——待测组相对荧光强度;

$F_{1,3}$ ——待测样品荧光强度;

$F_{1,4}$ ——介质对照组荧光强度。

1.6 绿脓菌素(PYO)的测定

参照 Lou 等^[19]的方法稍作修改。将共培养物上清液于 -80°C 超低温冰箱中预冻 2 h 后冻干浓缩。加入 3 mL 三氯甲烷,待完全溶解后加入 1 mol/L 的盐酸 1 mL,充分振荡后静置。待分层后取盐酸层测定其 $\text{OD}_{520\text{ nm}}$,此 $\text{OD}_{520\text{ nm}}$ 即表示 PYO 含量。

1.7 生物膜的测定

参照张立冬等^[20]的方法并稍作修改。PA 按体积分数 1%接种于 LB 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h 后,用 LB 培养基按 1:100 稀释,充分震荡备用。将 LAB 上清液按体积比 1:100 与稀释后的 PA 培养液混匀,移取 200 μL 至 96 孔酶标板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h,倒掉菌液,用 PBS 冲洗 4 次,烘干。吸取 200 μL 结晶紫染液染色 10 min,倒出染色剂再用 PBS 冲洗 4 次,烘干。加入 200 μL 脱色剂,测定 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 。以 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 表示生物膜的生成量,以 MRS 与 PA 共培养的 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 为阳性对照,并按式(3)计算细胞膜抑制率。

$$B_{FI} = \frac{A_1}{A_2} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

B_{FI} ——细胞膜抑制率,%;

A_1 ——各种 LAB 与 PA 共培养时所测的 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$;

A_2 ——MRS 与 PA 共培养时所测的 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 。

1.8 数据分析

采用 SPSS 20 单因素方差分析进行差异性分析($P < 0.05$),并使用 GraphPad Primer 8.5 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 LAB 抑菌能力

由表 1 和图 1 可知,LGchen、S-5-6 和 L1 3 株 LAB 的抑菌圈直径分别为 22.27,20.20,20.13 mm,显著高于其他 9 种 LAB 的,N34 的抑菌圈直径最小,为 12.33 mm,说明 LAB 对 PA 的抑菌效果具有菌株特异性。试验中 MRS-pH 4.0 作为参照也有一定的抑菌效果,说明酸对

PA 生长有一定的抑制效果,但筛选的 LAB 的抑制效果强于 MRS 抑制效果,推测 LAB 的抗菌作用除受酸影响外,还可能与 LAB 的其他代谢物质有关,如过氧化氢、乙酸、乳酸及其他有机酸和细菌素等物质均有抑菌作用。刘君等^[21]从鱼、虾肠道分离得到的戊糖片球菌对美人鱼发光杆菌、大肠杆菌、溶藻弧菌、铜绿假单胞菌、创伤弧菌、副溶血弧菌等有不同程度的抑制作用。朱英莲等^[22]从发酵食品中分离出的 6 株 LAB,其中 3 株有较好的抑制假单胞菌效果,产生的 LAB 素具有很好的耐热性,在酸性条件下表现出良好的抑菌效果。LAB 上清液对 PA 的生长也有明显的抑制效果,说明 LAB 的代谢物具有抗菌作用,其具体抗菌物质需进一步研究。

为研究 LAB 抑制 PA 感染的机制,选取 4 株抑菌高度敏感(LGchen、ZX5、L1 和 S-5-6)和 2 株抑菌中度敏感(N34 和 L23)的 LAB 进一步研究。经 16S rRNA 鉴定,N34 和 L23 为植物乳杆菌,S-5-6 和 ZX5L 为唾液乳杆菌,LGchen 和 L1 分别为格氏乳杆菌和戊糖片球菌。

2.2 LAB 信号分子 AI-2 的表达

LAB 群体感应信号分子 AI-2 具有保守性,利用指示菌 BB170 识别 LAB 产生的 AI-2 信号分子,LAB 可诱导 BB170 荧光酶基因的表达,从而产生发光反应。依据文献[23]报道,LAB 的 AI-2 表达最高值出现在稳定期初期或对数期末期,故采用培养 18 h 的 LAB 上清液进行测定。由图 2 可知,S-5-6、LGchen 和 ZX5 产生信号分子 AI-2 的能力较强,而 L23 表达 AI-2 的能力较弱。结合表 1 分析,推测 LAB 信号分子 AI-2 的表达可能与 LAB 的抑菌能力相关。AI-2 作为 LAB 种间交流信号分子,受其 QS 系统的调控,影响 LAB 的多项重要生理功能。邵长林^[24]发现粪肠球菌 V583 在培养过程中孵育过量的信

表 1 LAB 上清液对 PA 的抑菌效果[†]

菌种	抑菌圈大小/mm	敏感度	来源	菌种名称
N34	12.33±0.03 ^b	中度敏感	泡菜	植物乳杆菌
LGchen	22.27±0.27 ^e	高度敏感	酸奶	格氏乳杆菌
ZX5	18.13±0.21 ^{cd}	高度敏感	泡菜	唾液乳杆菌
L1	20.13±0.19 ^{de}	高度敏感	腐乳	戊糖片球菌
S-5-6	20.20±0.11 ^{de}	高度敏感	泡菜	唾液乳杆菌
L23	15.33±0.15 ^{bc}	中度敏感	发酵米	植物乳杆菌
N8	15.00±0.17 ^{bc}	中度敏感	泡菜	植物乳杆菌
N9	16.47±0.13 ^c	高度敏感	泡菜	植物乳杆菌
H27-12	15.47±0.10 ^{bc}	中度敏感	泡菜	未鉴定
G20	18.85±0.34 ^{cd}	高度敏感	鸡粪便	鸡乳杆菌
13-7	18.13±0.25 ^{cd}	高度敏感	鸡粪便	未鉴定
L2	16.67±0.30 ^c	高度敏感	腐乳	戊糖片球菌
MRS(pH 4.0)	9.13±0.02 ^a	中度敏感		

[†] 字母不同表示差异性显著($P < 0.05$)。

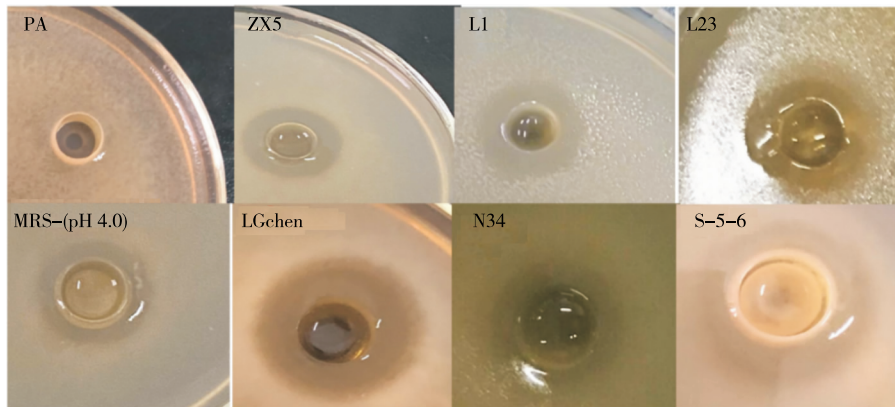


图1 LAB抑制PA生长

Figure 1 LAB inhibition the growth of PA

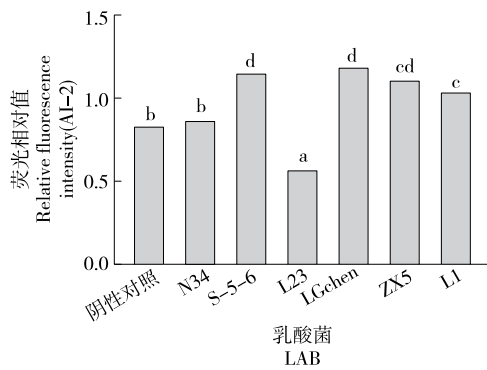
字母不同表示差异性显著($P < 0.05$)

图2 LAB信号分子AI-2的表达情况

Figure 2 Expression of LAB signal molecule AI-2

号分子 AI-2 会降低其翻译、代谢、能量产生等 15 个相关蛋白的表达量,并促进生物膜的形成。杨杰^[25]在培养植物乳杆菌 KLDS1.0391 时添加外源信号分子 AI-2,发现菌体细菌素产量增加,并且不同添加量对细菌素的促进作用不同。宋刚等^[26]研究发现,菌体释放的自诱导分子 AI-2 或者共培养环境中的某些特定菌株,能够激发 LAB 的群体感应系统,而 LAB 细菌素的产生受群体感应系统的调控,其合成量会提高,进而使得 LAB 对 PA 的抑菌能力提高。由此推测,LAB 的 AI-2 表达能力会促进其抗菌能力,LAB 的 AI-2 表达量高可能会增强其抑制 PA 的生长能力。

2.3 LAB上清液与PA共培养信号分子AI-2的表达

由图3可知,共培养物上清液的相对荧光强度有显著差异性($P < 0.05$),其中 LGchen 和 L1 对共培养的 AI-2 表达有明显的抑制作用,ZX5 与 S-5-6 对共培养的 AI-2 表达影响不大,而 N34 和 L23 上调了共培养的 AI-2 表达。

2.4 LAB对PYO表达的影响

由图4可知,6株LAB中LGchen、S-5-6和L23抑制绿脓菌素表达的效果显著($P < 0.05$),而菌株N34、L1上

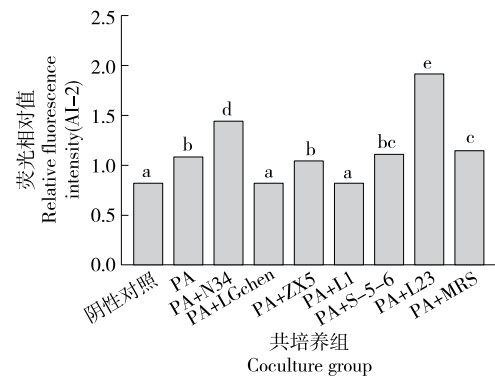
字母不同表示差异性显著($P < 0.05$)

图3 LAB上清液与PA共培养AI-2信号分子的表达情况

Figure 3 The expression of AI-2 signal molecule co-cultured with LAB supernatant and PA

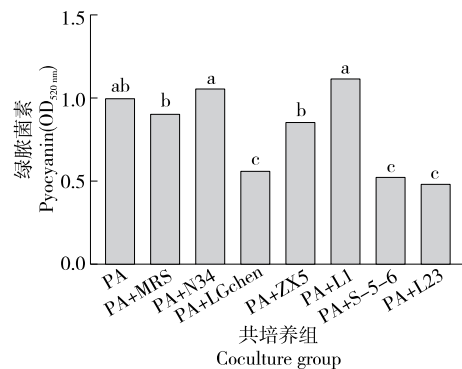
字母不同表示差异性显著($P < 0.05$)

图4 LAB上清液对PA的绿脓菌素表达的影响

Figure 4 The effect of LAB supernatant on the expression of pyocyanin in PA

调了PA绿脓菌素的表达,ZX5对PA绿脓菌素的表达影响不大。PYO是PA一种重要的毒力因子,与PA的致病性和感染性都密切相关^[27]。PYO是有活性的次级代谢物,可无阻碍穿透生物膜、打断呼吸链、产生大量的氧

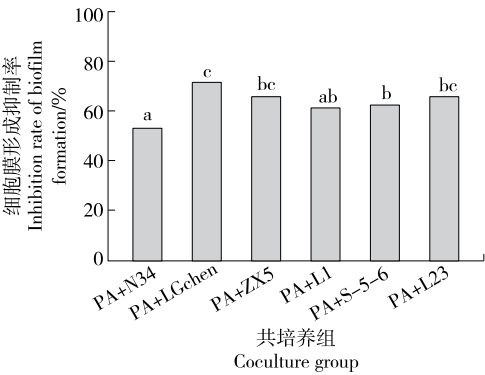
自由基和过氧化氢等导致细胞死亡^[28]。抑制 PYO 的表达,在一定程度上可以抑制 PA 的生长,从而降低 PA 的毒性,抑制其感染。唐云鹏等^[29]研究表明,不同浓度 PYO 对 PA 生长具有一定的促进作用。

2.5 LAB 对 PA 生物膜形成的影响

PA 生物膜的形成与其耐药性产生有密切关系,生物膜可以阻止 PA 与抗菌药物直接接触,从而提高 PA 对抗菌药物的耐药性^[30]。因此,去除病原菌的生物膜来抑制病原菌的生长与定植是一个非常好的防治病原菌感染的策略。由图 5 可知,6 株 LAB 均能抑制 PA 的生物膜形成,但抑制率存在差异,其中,LGchen 和 S-5-6 对 PA 生物膜形成的抑制率较好,N34 的抑制效果较差;而 ZX5、L1 和 L23 的抑制效果相差不大,说明 LAB 可以通过抑制 PA 生物膜形成达到抗菌的目的。Srikanjana 等^[31]研究表明,LAB 具有拮抗李斯特菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的作用,是因为 LAB 将其他致病菌的细胞膜破坏,从而使致病细胞萎缩或裂开从而达到抗菌作用。

2.6 LAB 拮抗 PA 的相关性分析

由表 2 可知,LAB 的抑菌能力与 LAB 抑制 PA 生物膜形成能力及 LAB 的 AI-2 表达量呈正相关,说明 LAB 抑制能力越强,其抑制 PA 生物膜形成的能力越强,同时,



字母不同表示差异性显著 ($P < 0.05$)。

图 5 LAB 抑制 PA 生物膜的形成

Figure 5 LAB inhibits the formation of PA biofilm

LAB 的 AI-2 表达影响 LAB 抑菌能力。LAB 抑菌能力与共培养物上清液 AI-2 表达量呈负相关,说明 LAB 的抑菌能力越强,PA 的 AI-2 表达能力越弱。LAB 的 AI-2 表达与共培养物上清液 AI-2 表达呈负相关,说明 LAB 表达 AI-2 能力越强,其抑制 PA 的 AI-2 表达能力越强。综上,LAB 的抑菌性与其 AI-2 的表达、抑制 PA 生物膜形成及抑制 PA 的 AI-2 表达有关,但与 PYO 的表达无显著相关性。

表 2 皮尔森相关性分析

Table 2 Pearson correlation analysis

指标	抑菌能力	生物膜抑制率	绿脓菌素表达量	乳酸菌 AI-2 表达量	共培养 AI-2 表达量
抑菌能力	1.000				
生物膜抑制率	0.803	1.000			
绿脓菌素表达量	-0.333	-0.505	1.000		
乳酸菌 AI-2 表达量	0.747	0.533	0.098	1.000	
共培养 AI-2 表达量	-0.748	-0.515	-0.305	-0.929	1.000

3 结论

试验筛选的植物乳杆菌 N34 和 L23,唾液乳杆菌 S-5-6 和 ZX5,格氏乳杆菌 LGchen 和戊糖片球菌 L1 可以拮抗铜绿假单胞菌感染,其抗菌机制与乳酸菌抑制铜绿假单胞菌生长,抑制铜绿假单胞菌生物膜形成,乳酸菌自身 AI-2 表达量以及抑制铜绿假单胞菌的 AI-2 表达量有关。其中,格氏乳杆菌 LGchen 和唾液乳杆菌 S-5-6 的整体抗菌效果比较显著,具有潜在商业应用的价值,后续将从代谢组学和转录组学进一步研究拮抗机制。

莫婷婷、张凤霞、陈政良、陈小珍等人参与该研究的试验数据测定,在此表示感谢!

参考文献

[1] KALIL A C, METERSKY M L, KLOMPAS M, et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated

pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America and the American thoracic society[J]. Clin Infect Dis, 2016, 63(5): e61-e111.
[2] 曾晓琼,周露,苏妙贞,等. 81 株铜绿假单胞菌 16S rRNA 基因序列测定及系统发育学分析[J]. 食品与机械, 2016, 32(11): 21-24, 89. ZENG Xiao-cong, ZHOU Lu, SU Miao-zhen, et al. Identification of 81 Pseudomonas aeruginosa by phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence[J]. Food & Machinery, 2016, 32(11): 21-24, 89.
[3] 闫芳,隋英杰,孙静,等. 桶装饮用水污染引起学生食物中毒的调查分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(8): 2 082-2 084. YAN Fang, SUI Ying-jie, SUN Jing, et al. Investigation and analysis of food poisoning among students caused by barreled drinking water pollution [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2011, 21(8): 2 082-2 084.
[4] 丁烨,戴璐,俞娟. 抗铜绿假单胞菌感染治疗方法研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2020, 30(6): 955-960. DING Ye, DAI Lu, YU Juan. Progress of research on treatment of-

- Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2020, 30(6): 955-960.
- [5] 丁诗瑶, 雷文平, 刘成国, 等. 乳酸菌细胞表面结构与胃肠道的相互作用[J]. 食品与机械, 2020, 36(4): 40-44.
DING Shi-yao, LEI Wen-ping, LIU Chen-guo, et al. Cell surface structure of lactic acid bacteria and its interaction with gastrointestinal tract[J]. Food & Machinery, 2020, 36(4): 40-44.
- [6] WAHEED H, XIAO Y, HASHMI I, et al. Insights into quorum quenching mechanisms to control membrane biofouling under changing organic loading rates[J]. Chemosphere, 2017, 182: 40-47.
- [7] 王良才, 姜黎明, 康子腾, 等. 植物乳杆菌 AY01 luxS 基因表达模式与功能的研究[J]. 生命科学研究, 2014, 18(3): 199-204.
WANG Liang-cai, JIANG Li-ming, KANG Zi-teng, et al. The research of expression pattern and function of *Lactobacillus plantarum* AY01 luxS gene[J]. Life Science Research, 2014, 18(3): 199-204.
- [8] 李雷兵, 朱寒剑, 郑心, 等. 乳酸菌群体感应的研究进展[J]. 中国酿造, 2021, 40(2): 5-11.
LI Lei-bing, ZHU Han-jian, ZHENG Xin, et al. Research progress of lactic acid bacteria quorum sensing[J]. China Brewing, 2021, 40(2): 5-11.
- [9] LIU Lei, WU Rui-yuan, ZHANG Jin-lan, et al. Overexpression of luxS promotes stress resistance and biofilm formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 by regulating the expression of multiple genes[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2 628.
- [10] PEZZULO A A, HORNICK E E, RECTOR M V, et al. Expression of human paraoxonase 1 decreases superoxide levels and alters bacterial colonization in the gut of drosophila melanogaster[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43777.
- [11] WASFI R, ABD EL-RAHMAN O A, ZAFER M M, et al. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(3): 1 972-1 983.
- [12] MEDELLIN-PENA M J, GRIFFITHS M W. Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(4): 1 165-1 172.
- [13] PARK H, YEO S, JI Y, et al. Autoinducer-2 associated inhibition by *Lactobacillus sakei* NR28 reduces virulence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7[J]. Food Control, 2014, 45: 62-69.
- [14] 陈小春, 严银春, 张甲生, 等. 太平洋杆菌对铜绿假单胞菌毒力因子的抑制作用[J]. 发酵科技通讯, 2017, 46(1): 25-29.
CHEN Xiao-chun, YAN Yin-chun, ZHANG Jia-sheng, et al. The inhibition of virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa* by *Oceanobacillus* sp.[J]. Bulletin of Fermentation Science and Technology, 2017, 46(1): 25-29.
- [15] RANA S, BHAWAL S, KUMARI A, et al. pH-dependent inhibition of AHL-mediated quorum sensing by cell-free supernatant of lactic acid bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Microb Pathog, 2020, 142: 104105.
- [16] CHAPPELL T C, NAIR N U. Engineered lactobacilli display anti-biofilm and growth suppressing activities against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. NPJ Biofilms Microbiomes, 2020, 6(1): 48.
- [17] 路则宝, 王靓贤, 姬志林, 等. 具抑菌活性乳酸菌筛选及抑菌活性物质分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(6): 178-181.
LU Ze-bao, WANG Liang-xian, JI Zhi-lin, et al. Screening of lactic acid bacteria with antibacterial activity and analysis of antibacterial substances[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(6): 178-181.
- [18] 蔡针华, 程娜, 贾震虎. 群体感应信号分子 AI-2 高产乳酸菌株筛选及特性研究[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(1): 66-71.
CAI Zhen-hua, CHENG Na, JIA Zhen-hu. Screening and characterization research of quorum sensing signaling molecule AI-2 high-yield *Lactobacillus* strains[J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(1): 66-71.
- [19] LOU Zai-xiang, WANG Hong-xin, TANG Yu-xia, et al. The effect of burdock leaf fraction on adhesion, biofilm formation, quorum sensing and virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Appl Microbiol, 2017, 122(3): 615-624.
- [20] 张立冬, 党芳芳, 赵思雨, 等. 影响乳酸菌生物膜形成的因素[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(10): 4-6, 14.
ZHANG Li-dong, DANG Fang-fang, ZHAO Si-yu, et al. Study of the influence of factors for *Lactobacillus* biofilm formation[J]. China Dairy Industry, 2016, 44(10): 4-6, 14.
- [21] 刘君, 林俊芳, 郭丽琼, 等. 水产源乳酸菌的多样性及抑菌活性研究[J]. 水产科学, 2015, 34(6): 351-357.
LIU Jun, LIN Jun-fang, GUO Li-qiong, et al. Diversity and antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquaculture[J]. Fisheries Science, 34(6): 351-357.
- [22] 朱英莲, 王鹏, 孙京新, 等. 乳酸菌素对铜绿假单胞菌的抑菌效果研究[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2019, 36: 142-146.
ZHU Ying-lian, WANG Peng, SUN Jing-xin, et al. Antibacterial effect of lactobacilin on *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Qingdao Agricultural University (Natural Science), 2019, 36(2): 142-146.
- [23] 李博, 顾悦, 燕彩玲, 等. 高产信号分子 AI-2 乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 食品工业科技, 2016, 37(2): 185-188.
LI Bo, GU Yue, YAN Cai-ling, et al. Screening and identification of AI-2 high-producing lactic acid bacteria[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(2): 185-188.
- [24] 邵长林. 粪肠球菌 V583 株 LuxS/AI-2 型群体感应系统的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012: 28-34.
SHAO Chang-lin. Functional analysis of LuxS/AI-2 type quorum sensing system in *Enterococcus faecalis* V583[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2012: 28-34.
- [25] 杨杰. AI-2 的体外合成及其对植物乳杆菌细菌素合成的影响[D]. 沈阳: 东北农业大学, 2015: 23-24.
YANG Jie. Synthesis of AI-2 in vitro and effect of AI-2 on bacteriocin synthesis of *Lactobacillus plantarum* [D]. Shenyang: Northeast Agricultural University, 2015: 23-24.

(下转第 149 页)

- sity, 2013: 1-63.
- [13] ZANQUI A B, DE MORAIS D R, DA S C, et al. Subcritical extraction of flaxseed oil with n-propane: Composition and purity[J]. Food Chemistry, 2015, 188: 452-458.
- [14] ZHANG Min, WAN Chu-yun, HUANG Feng-hong. Subcritical extraction of oil from dehulled cold-pressed rapeseed cake[J]. China Oils and Fats, 2015, 40(5): 14-17.
- [15] LIU Kun, WANG Lan, XUE Chang-hu, et al. Subcritical R134a extraction of *Euphausia pacifica* oil and analysis of fatty acid composition[J]. Food Science, 2013, 34(14): 96-99.
- [16] LIU Ping-huai, SHI Jie, SHEN Shi-jun. Subcritical fluid extraction of astaxanthin from Shrimp and crab shell waste [J]. Fine Chemicals, 2011, 28(5): 497-500.
- [17] 张潇予. 南极磷虾磷脂酰胆碱的提纯[D]. 济南: 山东师范大学, 2012: 1-66.
- ZHANG Xiao-yu. The extraction and purification of phosphatidylcholine in Antarctic krill (*Euphausia superba*) [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2012: 1-66.
- [18] 魏山山. 南极磷虾油中磷脂酰胆碱的提取、分离与分析[D]. 济南: 山东师范大学, 2014: 1-77.
- WEI Shan-shan. The extraction, separation and analysis of phosphatidylcholine in Antarctic krill (*Euphausia superba*) oil [D]. Jinan: Shandong Normal University, 2014: 1-77.
- [19] XIE Dan, JIN Jun, SUN Jiang, et al. Comparison of solvents for extraction of krill oil from krill meal: Lipid yield, phospholipids content, fatty acids composition and minor components[J]. Food Chemistry, 2017, 233: 434-441.
- [20] XU Bin, HAN Ji-hua, ZHOU Shi-long, et al. Quality characteristics of wheat germ oil obtained by innovative subcritical butane experimental equipment[J]. Journal of Food Process Engineering, 2016, 39(1): 79-87.
- [21] FOLCH J, LEES M, SLOANE-STANLEY G H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues[J]. Journal of Biology Chemistry, 1957, 226(1): 497-509.
- [22] MURALIDHAR R V, CHIRUMAMILA R R. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Canida cylindracea* using two different carbon sources[J]. Biochemical Engineering Journal, 2001, 9(1): 17-23.
- [23] 邢要非, 王延琴, 方丹, 等. 亚临界丁烷萃取棉籽油工艺及产物品质研究[J]. 中国油脂, 2014, 39(9): 5-9.
- XING Yao-fei, WANG Yan-qin, FANG Dan, et al. Subcritical butane extraction and quality analysis of cottonseed oil[J]. China Oils and Fats, 2014, 39(9): 5-9.
- [24] 刘日斌, 汪学德, 鞠阳, 等. 亚临界丁烷萃取芝麻油工艺及其品质分析研究[J]. 中国油脂, 2014, 39(5): 1-4.
- LIU Ri-bin, WANG Xue-de, JU Yang, et al. Subcritical butane extraction of sesame oil and its quality[J]. China Oils and Fats, 2014, 39(5): 1-4.
- [25] 马燕, 张健, 张谦, 等. 响应面法优化亚临界丁烷萃取杏仁油工艺研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(3): 238-241.
- MA Yan, ZHANG Jian, ZHANG Qian, et al. Research of processing optimization of almond oil by subcritical butane using response surface method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(3): 238-241.
- [26] 丁浩宸, 李栋芳, 张燕平, 等. 南极磷虾虾仁与4种海虾虾仁挥发性风味成分对比[J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(10): 57-62.
- DING Hao-chen, LI Dong-fang, ZHANG Yan-ping, et al. Comparison of volatile flavor compounds among peeled Antarctic krill and four species of peeled marine shrimps[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(10): 57-62.
- [27] 许刚, 丁浩宸, 张燕平, 等. 南极磷虾头胸部和腹部挥发性风味成分对比[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 146-149.
- XU Gang, DING Hao-chen, ZHANG Yan-ping, et al. Comparison of volatile flavor compounds in cephalothorax and abdomen of Antarctic krill[J]. Food Science, 2014, 35(22): 146-149.
- [28] GIOGIOS I, GRIGORAKIS K, NENGAS I, et al. Fatty acid composition and volatile compounds of selected marine oils and meals[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2009, 89(1): 88-100.
- (上接第11页)
- [26] 宋刚, 曹春振, 杨志馨, 等. 群体感应调控下的乳酸菌细菌素合成[J]. 食品与生物技术学报, 2020, 39(11): 12-17.
- SONG Gang, CAO Chun-zhen, YANG Zhi-xin, et al. Bacteriocin synthesis of lactic acid bacteria under quorum sensing[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2020, 39(11): 12-17.
- [27] 陈扬. 大蒜提取物竞争性阻断QS信号系统并降低铜绿假单胞菌毒力因子表达[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009: 14.
- CHEN Yang. The garlic extracts block the quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2009: 14.
- [28] 柴文成. 铜绿假单胞菌及其胞外产物绿脓菌素诱导人单核细胞免疫反应及在肺部感染中的作用机制[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2008: 42-52.
- CAI Wen-shu. Study on *Pseudomonas aeruginosa* and pyocyanin induced immunity reaction of human monocytic U937 cells and lung infection in rats [D]. Shenyang: China Medical University, 2008: 42-52.
- [29] 唐云鹏. 绿脓菌素对食源细菌生长和成膜影响的初步研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2017: 27-28.
- TANG Yun-peng. Effects of pyocyanin on the growth and biofilm formation of foodborne bacteria: A preliminary study [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2017: 27-28.
- [30] GROSSOVA M, RYSAVKA P, MAROVA I. Probiotic biofilm on carrier surface: A novel promising application for food industry[J]. Acta Alimentaria, 2017, 46(4): 439-448.
- [31] KLAYRAUNG S, OKONOGI S. Antibacterial and antioxidant activities of acid and bile resistant strains of *Lactobacillus fermentum* isolated from miang[J]. Braz J Microbiol, 2009, 40(4): 757-766.