

芽孢杆菌R1共培养对嗜水气单胞菌NJ-1 毒力基因表达的影响

何凤旭, 王全民, 黄路, 周志刚*

(中国农业科学院饲料研究所, 农业部饲料生物技术重点开放实验室, 北京 100081)

摘要: 为探讨芽孢杆菌潜在的淬灭靶点, 本研究通过芽孢杆菌R1与嗜水气单胞菌NJ-1共培养, 并对NJ-1生物量、信号分子产生量、毒力因子基因和群体感应(QS)关键调控基因表达量进行检测。结果显示: ①NJ-1单独培养时, 信号分子BHL和HHL的产量与NJ-1生长趋势一致, 在27 h时达到峰值并启动LuxR表达, 进而调控毒力因子金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、肠毒素、气溶素和溶血素等表达, 其在27~30 h时呈现峰值表达, 通路QseB在27~30 h启动表达, 48 h时达到峰值, 而种间调控LuxS基因表达一直处于低水平状态; ②与芽孢杆菌R1共培养时, 仅痕量AHLs信号分子被检出, 毒力因子相关基因表达量均显著下调; LuxR表达受抑制, LuxS在36 h时表达量显著上调, 未影响QseB正常表达; ③AHLs与R1共培养可被显著降解。研究表明, 芽孢杆菌R1抑制NJ-1毒力因子相关基因表达可能与其对NJ-1多QS系统进行调控相关联。

关键词: 嗜水气单胞菌; 芽孢杆菌; 群体感应; 毒力因子

中图分类号: Q 786; S 917.1

文献标志码: A

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是重要的水生病原菌, 每年给我国水产养殖业造成极大的经济损失, 同时还是重要的人畜共患病病原菌^[1-2]。该病原菌的致病性与其产生的毒力因子密切相关, 已报道的毒力因子包括丝氨酸蛋白酶(serine protease, Ser)、溶血素(hemolysin, Hem)、气溶素(aerolysin, Aer)、肠毒素(cytotoxic enterotoxin, Act)以及粘附素(adhesin, adh)如菌毛和表面S层蛋白等^[3-4]。这些毒力因子在宿主体内相互协同, 产生毒性效应, 并受密度效应调控, 即群体感应(quorum sensing, QS)调控系统的影响^[5-6]。

群体感应是细菌通过产生可扩散的小分子量自诱导物(autoinducer, AI)感知细胞群体密度变化, 从而进行基因表达调控的生理行为^[7]。据报道, 嗜水气单胞菌有3套独立的QS调控通路, 第1套信号系统受酰基高丝氨酸环内酯类化合物

(acyl homoserine lactone, AHL)调控(属自体诱导物1, 即AI-1型), 嗜水气单胞菌主要产N-丁酰基-高丝氨酸内酯(N-butanoyl homoserine lactone, BHL)和N-己酰基-高丝氨酸内酯(N-hexanoylhomoserine lactone, HHL)两类信号分子, 其在环境中富集, 达到一定阈值后与细胞内的蛋白受体结合并激活受体(LuxR), 从而激活或抑制目标基因的转录, 调节病原菌生物膜、VI型分泌系统和运动性等^[8]; 第2套信号系统受吡喃酮二酯(AI-2)调控, 属种间调控类型, 其中S-核糖高半胱氨酸(S-ribosylhomocysteine, SRH)裂解酶(LuxS)参与催化合成AI-2, LuxS基因突变后可促进生物膜形成, 并导致运动性下降^[6]; 第3套信号系统是QseB/QseC双组分调控系统, 受类肾上腺素信号分子(AI-3)调控, 细胞外膜受体QseC识别AI-3, QseC感应并接收该类信号分子后

收稿日期: 2015-08-13 修回日期: 2015-12-07

资助项目: 国家“九七三”重点基础研究发展计划(2015CB150600)

通信作者: 周志刚, E-mail: zhou_zg@msn.com

通过磷酸化而被激活,进一步促使QseB应答调节器磷酸化^[6],嗜水气单胞菌QseB突变株生物膜形成能力增强,蛋白酶和内毒素表达能力下降,另外运动性也下降^[6,8]。

芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)作为益生菌可提高养殖鱼类对嗜水气单胞菌的免疫保护率^[9],一般研究芽孢杆菌主要针对其产抗生素、刺激宿主免疫、调节消化道微生态等途径^[10-12],较少有研究关注其群体感应调控机制^[13]。因此,本研究拟通过共培养手段研究芽孢杆菌(以芽孢杆菌R1为对象)对嗜水气单胞菌NJ-1毒力因子的表达调控,着重比较这些表达调控与不同QS路径的潜在相关性,为下一步通过QS“全”路径阻断实现高效防治奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件

嗜水气单胞菌NJ-1从患病鲫(*Carassius auratus*)体内分离,由南京农业大学刘永杰老师提供,芽孢杆菌R1筛选自大西洋鲑(*Salmo salar*)肠道^[12],由丹麦科技大学Lone Gram教授提供,培养条件为LB培养基25℃,200 r/min过夜培养。

1.2 实验设计及取样

过夜活化的嗜水气单胞菌NJ-1和芽孢杆菌R1可达到 10^9 cfu/mL,分别将这2种菌进行10倍梯度稀释,按约 10^5 cfu/mL接种量接入含200 mL LB的1 L锥形瓶内。实验设置对照组(NJ-1培养组)和处理组(NJ-1+R1共培养组,菌数1:1比例),每个处理设3个平行。25℃、200 r/min下培养,分别于2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、27、30、36、48和60 h取2 mL培养液,其中取500 μL 10倍梯度稀释后涂LB板,25℃培养48 h,计数平板上的菌落数,其余培养液-80℃冻存。

1.3 信号分子萃取及LC-MS检测

取1.2 mL上述培养液样于12 000 r/min离心5 min,吸取1 mL离心后的上清液,加入2 mL酸化乙酸乙酯(含0.5%的甲酸),振荡抽提15 min,并于室温静置10 min,吸取1.5 mL上清液,在

40℃用超临界氮气对物料进行萃取,最终溶于0.4 mL 40%乙酸乙酯/60%酸化的去离子水(1%甲酸)中,并加入标准品C4-d5-HSL使其终浓度为10 μg/mL,-20℃保存备用。

HPLC-MS检测系统为Agilent 1290 Infinity LC联用Agilent 6490三级串联LC/MS检测器。色谱条件:色谱柱为Agilent Poroshel 120 Phenyl Hexyl 2.7 μm; 2.1 mm×100 mm;流动相:甲醇-水(体积比50:50),进行梯度洗脱,流速0.3 mL/min,柱温40℃。质谱条件:ESI(+)离子源,喷雾电压:314 kV,脱溶剂温度:300℃,离子源温度:100℃,锥孔电压:30 V,氮气流量:6 L/h。所有样品及溶剂均经0.45 μm有机膜过滤,上样量设为1 μL。

1.4 毒力基因及QS调控基因表达

取500 μL培养液,离心弃上清液,加入1 mL TRIzol,剧烈振荡15 s,室温放置5 min,加入0.2 mL氯仿,再剧烈振荡15 s,室温放置3 min。4℃12 000 r/min离心15 min,取上清液,然后加入0.5 mL异丙醇,室温放置20 min,12 000 r/min离心15 min,用75%乙醇洗涤RNA沉淀,最后加入50 μL无Rnase水,1.0%琼脂糖电泳检测提取质量,Eppendorf微量核酸检测仪定量RNA。取1 μg RNA,采用TIANGEN Fast Quant cDNA试剂盒进行cDNA反转。

荧光定量PCR反应体系为20 μL,10 μL SYBR GREEN mastermix,0.5 μmol/L引物,0.5 μL cDNA,其余ddH₂O补齐。实时定量采用3步PCR扩增法,95℃30 s,预变性,95℃30 s,60℃30 s,72℃30 s,40个循环,反应结束后,检测产物的熔解曲线验证引物的特异性。全部引物见表1,以基因回旋酶B-subunit(β -subunit)和伴侣素(*cpn60*)作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法处理数据。

1.5 芽孢杆菌R1降解信号分子

设计2个处理组:CK处理组(终浓度10 μmol/L BHL溶液)及T处理组(10 μmol/L BHL和芽孢杆菌R1共培养),25℃下培养,12 h内每2 h取样,然后对所取样品进行萃取并通过LC-MS检测BHL含量。

表 1 设计引物

Tab. 1 Primers used in this study

基因 gene	名称 name	序列 sequence
丝氨酸蛋白酶	Ser F	GCGTGCAGGGTCAGGGCAT
serine protease (<i>Ser</i>)	Ser R	CGGATCGGTCGGGGTGGGG
金属蛋白酶	MepA F	CACCAACACCCAGAAGAGCGACAT
metalloprotease (<i>MepA</i>)	MepA R	AGGCACCAAACCAGCTGCGATAAC
内毒素	Act F	CGGCTATGATGTCACCCTGCGTTAC
cytotoxic enterotoxin (<i>Act</i>)	Act R	TCGATGGAGAGTTCGGTTTCCCCT
气溶素	Aer F	GCTATGATGTCACCCTGCGTTACG
aerolysin (<i>Aer</i>)	Aer R	GATGGAGAGTTCGGTTTCCCCTAC
血溶素	Hem F	CAAGGGGTTCTGTGCCGAATCTGG
hemolysin (<i>Hem</i>)	Hem R	ATGGGGCGGATGTTGACCGAGGAG
脂肪酶	Lip F	GCCGCTGAATCCCTCCTCCTAC
extracellular lipase (<i>Lip</i>)	Lip R	TGCTGCCGACGTTGTTCTTGATAG
<i>LuxS</i>	LuxS F	GCAGACCCCGAACAAGGACACC
	LuxS R	CACGCATGAAAACCGGCAAACAG
<i>LuxR</i>	LuxR F	TGATGGGGTTGGCGGGGAGTT
	LuxR R	CAGGAGAGGATGGGCGAGGACT
<i>QseB</i>	QSEB F	CCAGTCTCCCGCATCACCAAC
	QSEB R	GAGTCCCTGTCTCTCCCCGC
促旋酶	B-subunit F	GTGCGTGAAGGCTGATTGCCGT
gyrase B-subunit	B-subunit R	GCTTCTACCCATCGCCTGTTCG
伴侣蛋白	cpn60 F	ACCGTGGCTACCTCTCCCCCTAC
chaperonin	cpn60 R	TTGCCCGCCTTGGCTACGCCTTC

1.6 数据分析

数据用SPSS13.0软件进行方差分析, 显著性分析采用Turkey进行多重比较, 显著性水平设 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 嗜水气单胞菌NJ-1与芽孢杆菌R1共培养生长曲线

生长曲线划分: 0~4 h迟缓期, 4~12 h指数期, 12~36 h平稳期, 36~60 h衰亡期(图1)。芽孢杆菌R1共培养不影响嗜水气单胞菌NJ-1生长状态, 且芽孢杆菌R1自身生长良好。

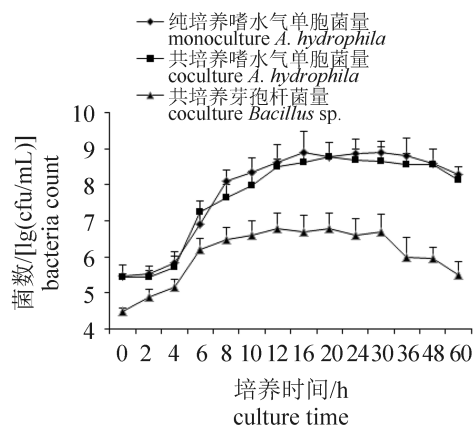


图 1 嗜水气单胞菌NJ-1和芽孢杆菌R1生长曲线
Fig. 1 The growth curve of *A. hydrophila* NJ-1 and *Bacillus* sp. R1

2.2 嗜水气单胞菌NJ-1信号分子生产曲线

嗜水气单胞菌NJ-1产信号分子BHL和HHL,其中BHL产量远高于HHL(图2)。嗜水气单胞菌NJ-1单独培养时,在6 h菌体密度达到 10^6 个/mL时,可检测到信号分子BHL存在,6~16 h呈线性增长,16~36 h时缓慢增长,36~60 h时呈下降趋势;信号分子HHL产量在生长过程中也表现出相同趋势。嗜水气单胞菌NJ-1和芽孢杆菌R1共培养时,仅在6~24 h内检测到痕量BHL和HHL。

2.3 嗜水气单胞菌NJ-1纯培养条件下毒力因子基因及QS通路关键调控基因表达水平

毒力因子基因*MepA*、*Ser*、*Act*及*Hem*表达表现出相同趋势,即在培养10~14 h时基因表达量呈显著增长,16~24 h时呈下降趋势,27 h时这些基因表达水平又显著上升(图3)。从整个生长周期看,*MepA*、*Ser*和*Hem*在27 h时表达水平最高(BHL产量在该时间点也达到峰值),36~48 h时上述基因的表达量呈下降趋势。*Aer*在8~30 h表达水平呈上升趋势,30 h时达到峰值,然后在36~48 h时表达量下降;而分泌型脂肪酶基因(*Lip*)在8~27 h时表达水平较低,30~60 h时表达水平显著上升,60 h时达到峰值。

第1套(种内)QS调控通路AI-1受体蛋白基因*LuxR*在8~14 h时表达水平波动较大,10 h时显著下降,12 h时显著上升,而14 h时又显著下降,14~24 h表达较稳定,维持在8 h时表达水平,27~36 h表达显著上调,30~36 h时达到峰值,而

48~60 h时表达水平回复到8 h时低水平状态。第2套(种间)QS调控通路关键基因*LuxS*的表达一直处于低水平状态,未出现明显上调时间点。第3套QS通路关键基因*QseB*在8~22 h时处于低水平表达,24~48 h时表达显著上调,48 h达到最大峰值,60 h时降到其30 h时水平(图4)。

2.4 芽孢杆菌R1对嗜水气单胞菌NJ-1毒力因子基因及QS通路关键基因表达水平的影响

芽孢杆菌R1显著降低共培养时的NJ-1毒力因子表达水平:与共培养时相比较,*MepA*和*Ser*在10 h后出现明显的表达差异,最大表达差异分别为5倍(27 h)和2倍(22 h)差异;*Hem*和*Aer*表达量在14 h后出现显著的表达差异,其最大差异分别为6倍(27 h)和4倍(27 h);*Lip*在24 h后才出现明显的表达差异,最高达到5倍差异(60 h);而*Act*在整个周期内表达水平略上升,无统计学上的差异(图5)。

芽孢杆菌R1对嗜水气单胞菌NJ-1信号通路关键基因的影响表现在*LuxR*单独培养下较共培养条件下20~36 h间有较高水平的表达量,培养48 h后其表达量下降;*LuxS*在2种培养条件下具有一致的表达趋势,除22 h时共培养下表达量明显上升;*QseB*在2种培养条件下表达水平保持一致(图5)。

2.5 芽孢杆菌R1降解信号分子BHL验证

未加芽孢杆菌R1的对照组(CK)BHL相对稳定,含量保持不变,而芽孢杆菌R1处理4 h后

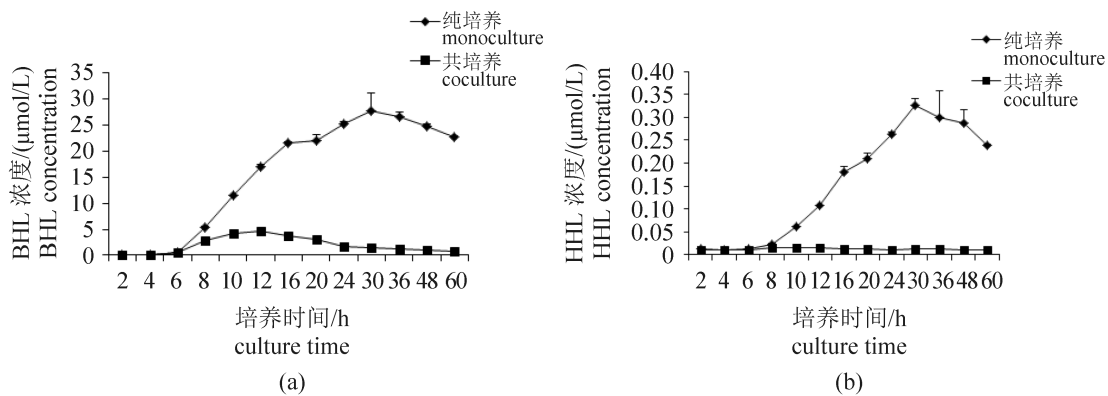


图2 纯培养条件下嗜水气单胞菌NJ-1信号分子BHL(a)和HHL(b)生产曲线

Fig. 2 The QS signal of *N*-butanoyl homoserine lactone (BHL)(a) and *N*-hexanoyl homoserine lactone (HHL)(b) producing curve under culture conditions

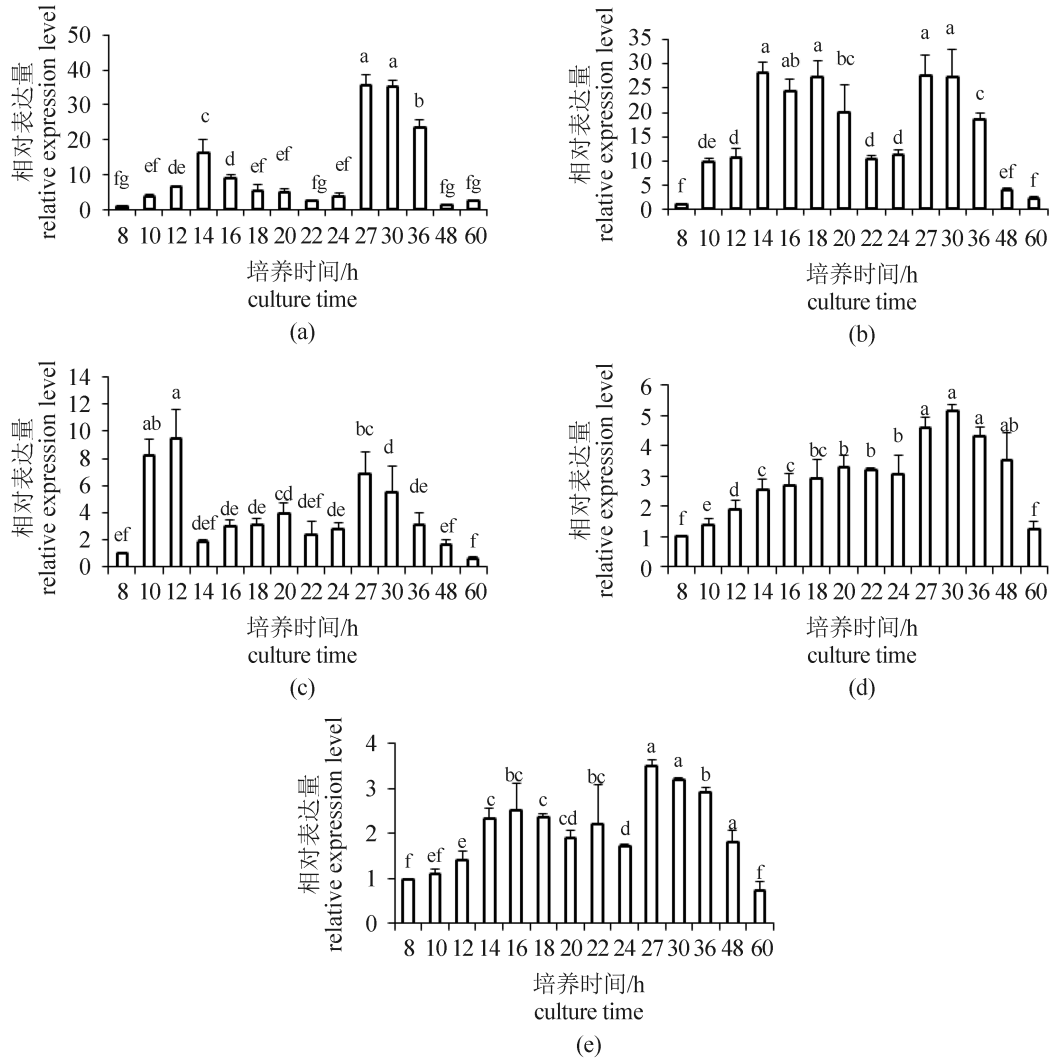


图3 纯培养条件下嗜水气单胞菌NJ-1毒力因子表达情况

(a) *MepA*; (b) *Ser*; (c) *Act*; (d) *Aer*; (e) *Hem*; 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$), 相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$)

Fig. 3 The virulence gene expression levels of *A. hydrophila* NJ-1 under monoculture conditions

Values with different letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), while with the same letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$)

BHL被完全降解(图6)。

3 讨论

本研究采用HPLC-MS/MS技术, 在质谱多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式下, 可在 μg 级别浓度范围快速、定性和定量分析嗜水气单胞菌产生的信号分子, 另外在萃取过程中加入已知浓度的标准品C4-d5-HSL来判断每次萃取过程的效率, 以减少实验过程中的误差。目前采用TLC-Biosensor检测信号分子, 由于不同的细菌生物感应器对不同酰基侧链长度的

AHLs敏感性不同, 因此不能准确地定性AHLs的种类, 此外该方法也无法进行准确的定量分析^[14-15]。以往研究表明嗜水气单胞菌产生2种类型的信号分子BHL和HHL, 其中以BHL为主^[16], 与本研究结果一致。在纯培养条件下, BHL和HHL积累状态与生长曲线表现出一致的变化趋势, 在稳定期30 h时达到阈值, 进入衰亡期后下降, 这与在纯培养下研究异养菌(heterotrophic bacteria, Z-TG01)生长曲线与信号分子间的关系结果一致^[17]。

关于QS调节病原菌毒力因子方面的报道较

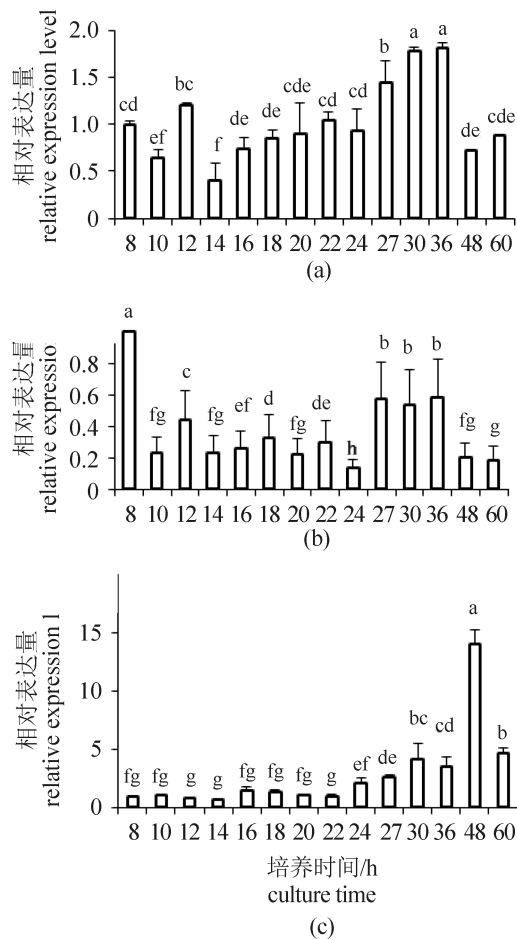


图4 纯培养条件下嗜水气单胞菌NJ-1 QS主要信号调控通路表达情况

(a) *LuxR*; (b) *LuxS*; (c) *QseB*

Fig. 4 The main QS regulator expression levels of *A. hydrophila* NJ-1 under monoculture conditions

多^[5, 16, 18-19], 本研究中嗜水气单胞菌所产生的 *MepA*、*Ser*、*Act*、*Hem*和*Aer*毒力因子均在27~30 h时达到较高水平的表达量, 而信号分子BHL和HHL产量在该阶段也达到阈值, 另外信号分子受体蛋白Lux R在该时间点也达到峰值, 表明这些毒力因子可能受到Lux I/R信号通路调控。研究表明嗜水气单胞菌 Δ *ahyRI*突变株的毒力因子基质金属蛋白酶、血溶素和生物膜相关基因表达量下降, 并降低受试动物的死亡率^[16, 18-19]。AI-2是细菌种间交流中起通讯作用的信号分子, 研究表明其调控嗜水气单胞菌相关毒力因子的表达, 如生物膜、蛋白酶和细菌的运动性^[18, 20]。本实验中NJ-1单独培养时*LuxS*基因表达一直呈现较低水

平, 其与Lux I/R信号通路间是否存在交互作用仍有待研究。另外新近发现的*QseB/C*系统能调节嗜水气单胞菌感染宿主能力, 其突变体的蛋白酶和肠毒素活性下降^[6, 20]。而本研究中*QseB*在27 h时上调表达, 48 h时达到峰值; *LuxR*在48 h时表达水平下降到初始状况, 该阶段的基质金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、内毒素、血溶素和气溶素毒力因子仍有较高表达水平, 表明*QseB*和*LuxR* 2个系统间存在相互协作, 另有证据表明二者间通过第二信使环二磷酸鸟苷(c-di-GMP)进行协调^[6, 18]。在目前发现的嗜水气单胞菌中均有脂肪酶基因, 被视作毒力因子的一种^[19], 本研究中其在30 h时启动表达, 在衰亡期60 h时才达到峰值, 其是否受QS调控仍有待进一步研究。此外, 嗜水气单胞菌的3种QS通路间的协作关系有待进一步揭示。

水产芽孢杆菌SS4可以降低绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PAO1)的生物膜形成、总蛋白酶量和绿脓菌素^[21], 但是否由芽孢杆菌SS4生成的淬灭酶降解绿脓杆菌PAO1的AHLS型信号分子, 从而减弱绿脓杆菌PAO1的毒力效应仍缺乏直接证据。本实验将信号分子BHL添加到芽孢杆菌R1中, 培养4 h可将BHL完全降解, 证实芽孢杆菌R1存在淬灭酶编码基因, 可迅速捕获和降解体外的信号分子。在嗜水气单胞菌NJ-1与芽孢杆菌R1共培养时, NJ-1的生长并未受到R1的抑制, *MepA*、*Ser*、*Act*、*Hem*、*Aer*和*Lip*的表达水平均显著下降, 其中*Act*、*Hem*和*Aer*基因表达被抑制程度最大, *LuxI*受体蛋白*LuxR*也受到抑制, 证实芽孢杆菌R1通过调控嗜水气单胞菌Lux I/R通路来降低毒力因子表达, 而非通过抑制嗜水气单胞菌的生长来产生效应, 这与以往研究结果一致^[22-25]。来源于芽孢杆菌的高丝氨酸内酯酶可以降解革兰氏阴性菌产生的信号分子, 在饲料中额外添加可以降低病原菌攻毒水产动物的致死率^[21-22]。芽孢杆菌R1能够上调嗜水气单胞菌种间调控通路*LuxS*(36 h), 提前上调*QseB*通路(分别为20和27 h), 然而该方面的研究未见报道, 其对QS *LuxS*和*QseB*通路的影响仍有待进一步的研究, 也提示仅仅阻截第1套QS通路对于防治嗜水气单胞菌病害可能不够。

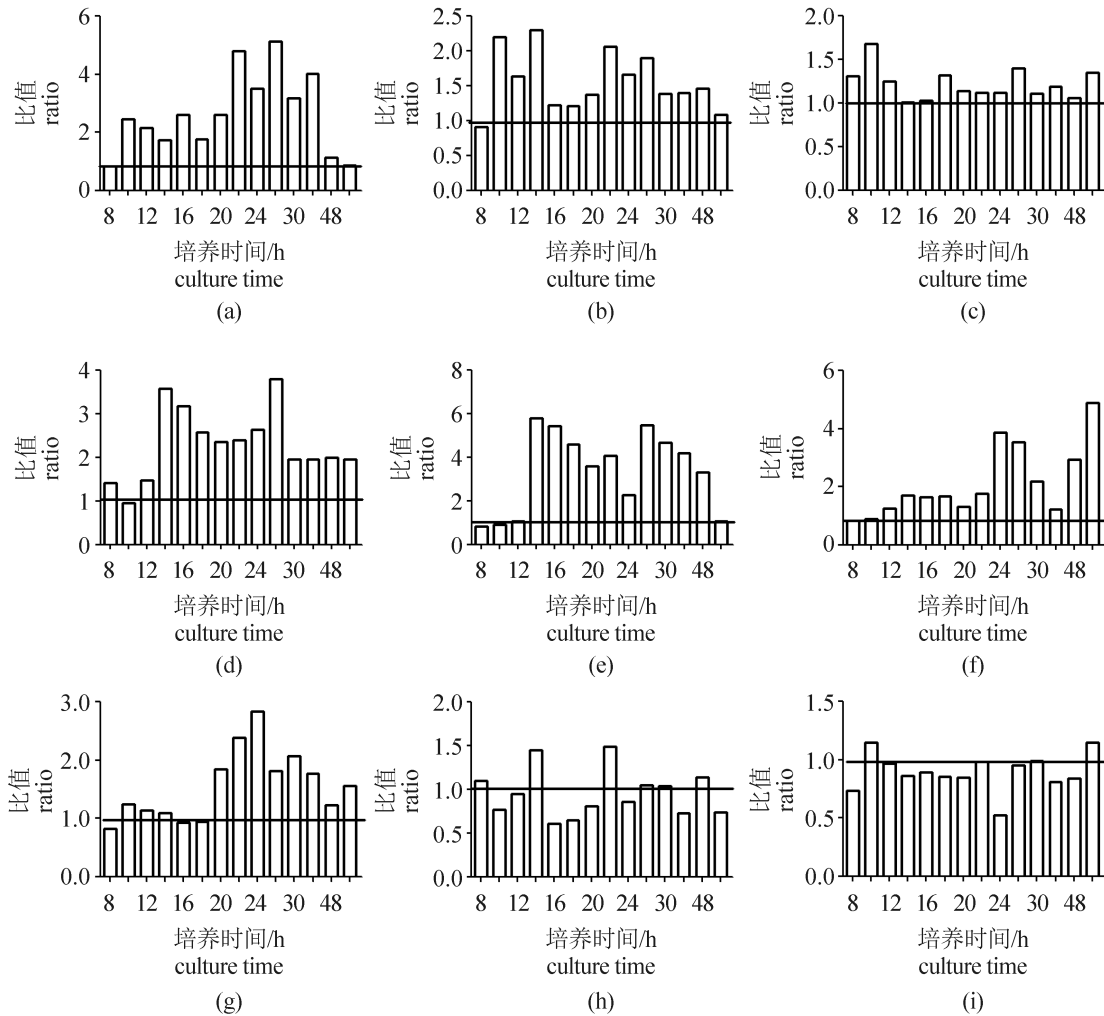


图 5 嗜水气单胞菌NJ-1在单独培养时与芽孢杆菌R1共培养时基因表达水平对应比值

(a)MepA; (b)Ser; (c)Act; (d)Aer; (e)Hem; (f)Lip; (g)LuxR; (h)LuxS; (i)QseB

Fig. 5 The ratio of gene expression level of *A. hydrophila* NJ-1 monoculture to the co-culture with *Bacillus* sp. R1

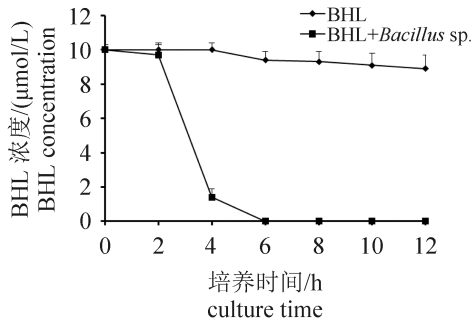


图 6 芽孢杆菌R1对信号分子BHL的降解曲线

Fig. 6 The degrading curve of BHL by the culture of *Bacillus* sp. R1

参考文献:

[1] Nielsen M E, Høi L, Schmidt A S, *et al.* Is *Aeromonas hydrophila* the dominant motile *Aeromonas* species that

causes disease outbreaks in aquaculture production in the Zhejiang Province of China [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2001, 46(1): 23–29.

[2] Gopalakannan A, Arul V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds [J]. *Aquaculture*, 2006, 255(1–4): 179–187.

[3] Cumberbatch N, Gurwith M J, Langston C, *et al.* Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease [J]. *Infection and Immunity*, 1979, 23(3): 829–837.

[4] Fuqua W C, Winans S C, Greenberg E P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell

- density-responsive transcriptional regulators [J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(2): 269–275.
- [5] Khajanchi B K, Sha J, Kozlova E V, *et al.* *N*-Acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and *in vivo* virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microbiology*, 2009, 155(11): 3518–3531.
- [6] Khajanchi B K, Kozlova E V, Sha J, *et al.* The two-component QseBC signalling system regulates *in vitro* and *in vivo* virulence of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microbiology*, 2012, 158(1): 259–271.
- [7] Grim C J, Kozlova E V, Sha J, *et al.* Characterization of *Aeromonas hydrophila* wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes [J]. *MBio*, 2013, 4(2): 1–13.
- [8] Kirke D F, Swift S, Lynch M J, *et al.* The *Aeromonas hydrophila* LuxR homologue AhyR regulates the *N*-acyl homoserine lactone synthase, AhyI positively and negatively in a growth phase-dependent manner [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 241(1): 109–117.
- [9] Chu W, Lu F, Zhu W, *et al.* Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 110(1): 202–208.
- [10] Cutting S M. *Bacillus* probiotics [J]. *Food Microbiology*, 2011, 28(2): 214–220.
- [11] Nimrat S, Suksawat S, Boonthai T, *et al.* Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) [J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 159(3–4): 443–450.
- [12] Hwang K Y, Cho J H, Lee J Y, *et al.* The benefits of using *Bacillus* as a probiotic [J]. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 11(18): 3457–3462.
- [13] Fujiya M, Musch M W, Nakagawa Y, *et al.* The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN₂, a host cell membrane transporter [J]. *Cell Host & Microbe*, 2007, 1(4): 299–308.
- [14] Middleton B, Rodgers H C, Cámara M, *et al.* Direct detection of *N*-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 207(1): 1–7.
- [15] 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): 166–169.
- Chu W H, Liu Y W, Zhu W. Rapid detection of quorum sensing signal molecules *N*-acylhomoserine lactones and its inhibitors [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2011(3): 166–169 (in Chinese).
- [16] Swift S, Karlyshev A V, Fish L, *et al.* Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate *N*-acylhomoserine lactone signal molecules [J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(17): 5271–5281.
- [17] Tang X X, Bi X D, Xing K Z, *et al.* Detection of acylated homoserine lactone (AHL) in the heterotrophic bacteria Z-TG01 and its ecological action on the algae, *Chlorella vulgaris* [J]. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 2012, 64: 557–560.
- [18] Khajanchi B K, Kirtley M L, Brackman S M, *et al.* Immunomodulatory and protective roles of quorum-sensing signaling molecules *N*-acyl homoserine lactones during infection of mice with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(7): 2646–2657.
- [19] Chu W H, Yan J, Liu Y W, *et al.* Role of the quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Aeromonas hydrophila* [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5(32): 5819–5825.
- [20] Kozlova E V, Khajanchi B K, Popov V L, *et al.* Impact of QseBC system in c-di-GMP-dependent quorum sensing regulatory network in a clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2012, 53(3–4): 115–124.
- [21] Chen R D, Zhou Z G, Cao Y A, *et al.* High yield expression of an AHL-lactonase from *Bacillus* sp. B546 in *Pichia pastoris* and its application to reduce *Aeromonas hydrophila* mortality in aquaculture [J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(1): 1–10.
- [22] Cao Y A, He S X, Zhou Z G, *et al.* Orally administered thermostable *N*-acyl homoserine lactonase from *Bacillus* sp. strain A196 attenuates *Aeromonas hydrophila* infection in zebrafish [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(6): 1899–1908.
- [23] Musthafa K S, Saroja V, Pandian S K, *et al.* Antipathogenic potential of marine *Bacillus* sp. SS4 on

- N*-acyl-homoserine-lactone-mediated virulence factors production in *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) [J]. Journal of Biosciences, 2011, 36(1): 55–67.
- [24] Zamani M, Behboudi K, Ahmadzadeh M. Quorum quenching by *Bacillus cereus* U92: A double-edged sword in biological control of plant diseases [J]. Biocontrol Science and Technology, 2013, 23(5): 555–573.
- [25] Zhang K, Zheng X, Shen D S, *et al.* Evidence for existence of quorum sensing in a bioaugmented system by acylated homoserine lactone-dependent quorum quenching [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(8): 6050–6056.

Effects of coculture of *Bacillus* sp. R1 and *Aeromonas hydrophila* NJ-1 on the virulent factor gene expression of NJ-1

HE Suxu, WANG Quanmin, HUANG Lu, ZHOU Zhigang*

(Key Laboratory for Feed Biotechnology of the Ministry of Agriculture, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China)

Abstract: To evaluate the effect of quorum sensing (QS) of *Aeromonas hydrophila* NJ-1 on modulating pathogenic bacterial virulent factor, NJ-1 was co-cultured with *Bacillus* sp. R1, a AHLs degrading strain. The results showed that under monoculture conditions, the AHL amount of NJ-1 varied with the same trend as the bacteria growth curve. The maximum activity of both AHLs and virulence appeared at 27–30 h, and then decreased with the decline phase. The expression of *QseB* started at 27 h, and peaked at 48 h, while the expression of *LuxS* kept at a lower level. Under coculture conditions, AHLs bioactivity was detected only in trace level. Accordingly, the expression of *LuxR* was not upregulated, and the expression of virulence factors was also distinctly decreased compared to the monoculture. *LuxS* were upregulated at 36 h, while the expression pattern of *QseB* was similar to the monoculture. In conclusion, *Bacillus* sp. R1 could reduce the virulence of *A. hydrophila* NJ-1 by the regulation of the QS of Lux I/R through degrading AHLs activity.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; *Bacillus* sp.; quorum sensing; virulent factor

Corresponding author: ZHOU Zhigang. E-mail: zhou_zg@msn.com

Funding projects: National Basic Research Program (973 Program) (2015CB150600)