

## 草莓酸对莓实假单胞菌群体感应的抑制作用

崔方超<sup>1</sup>, 王芊芊<sup>1</sup>, 刘佳宜<sup>1</sup>, 王当丰<sup>1</sup>, 檀茜倩<sup>1</sup>, 李秋莹<sup>1</sup>, 励建荣<sup>1\*</sup>, 李婷婷<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>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

中国轻工业海水鱼加工重点实验室 辽宁锦州 121013

<sup>2</sup>大连民族大学生命科学院 辽宁大连 116600)

**摘要** 目的:利用报告菌株紫色杆菌探究草莓酸的群体感应抑制性及其对莓实假单胞菌的群体感应作用。方法:利用细菌凋亡率、气相色谱-质谱分析、生物膜的抑制效果、胞外聚合物生成量以及观察细菌的群集和泳动等参数,来研究草莓酸对莓实假单胞菌群体感应的抑制效果。结果:草莓酸的最小抑菌浓度(MIC)为 0.5 mg/mL,亚抑菌浓度下草莓酸虽然降低了菌株 CV026 产生紫色素的能力,但对细胞凋亡没有任何影响。通过气相色谱-质谱定量检测发现莓实假单胞菌所产的群体感应信号分子是 C<sub>8</sub>-HSL 和 C<sub>10</sub>-HSL,草莓酸对信号分子的分泌产生抑制效果。在亚抑菌浓度下草莓酸对莓实假单胞菌的生物被膜形成量为 21.06%,细菌的群集和泳动的抑制率分别降低 34.06%和 75.02%,且呈现质量浓度依赖性。结论:草莓酸具有较好的群体感应抑制性,可以作为水产保鲜中的群体感应抑制剂。

**关键词** 草莓酸; 莓实假单胞菌; 群体感应; 抑制剂

**文章编号** 1009-7848(2024)05-0171-11 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.05.013

群体感应(Quorum sensing, QS)是指细菌能够感知所处环境变化,在自身分泌的信号分子或外源信号分子的介导下,以种群密度为函数,操控相关表型的改变,当其含量到达某一特定的数值时,对环境劣变作出积极的响应,启动相关基因转录应答<sup>[1-2]</sup>。目前研究表明多种微生物的行为,如海洋菌的发光现象,胞外蛋白酶、脂酶、抗生素分泌以及鞭毛运动控制生物被膜堆积等行为均由 QS 系统信号分子介导调控<sup>[3-6]</sup>。另外,在菌间存在的群体感应系统中,优势细菌在定植环境,病原微生物对宿主的感染以及食品变质等方面扮演着关键角色<sup>[7]</sup>。

水产品中因富含的蛋白质以及不饱和脂肪酸等营养物质而被人们认为是优质的营养物质来源,然而其富含营养物质以及大量的水分,导致新鲜水产品比其它食品更容易腐败变质。在水产品的腐败变质中,一种或几种微生物会表现出以较

低的数量存在,而随着腐败过程的不断加深,繁殖速率会变得更快速且致腐能力更强,逐渐在腐败终期占领主导地位,成为水产品的优势或特定腐败菌(Specific spoilage organisms, SSOs)<sup>[8]</sup>。假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)属于嗜冷性微生物,是冷藏条件下水产品的特定腐败菌<sup>[9-12]</sup>。莓实假单胞菌(*Pseudomonas fragi*)在有氧贮藏条件下是水产品中的优势腐败菌,在贮藏、运输过程中可以大量生长并分泌多种胞外酶,其中 *N*-酰基-高丝氨酸内酯类化合物(AHLs)是一种能够调控致腐能力,介导 QS 系统的活性分泌物质<sup>[13]</sup>,因此,阻断 QS 系统成为保鲜水产品的新途径。

针对群体感应系统的抑制剂(Quorum sensing inhibitor, QSI)并不直接杀死细菌,而是通过干扰细菌生物被膜的形成、毒力因子的产生或致病基因的表达来阻止其功能表达。目前对群体感应抑制剂的研究已取得一些进展。刘佳宜等<sup>[14]</sup>的报道称乙基麦芽酚可作为 QSI,能抑制杀鲑气单胞菌的 QS 现象并抑制其腐败。陈敏等<sup>[15]</sup>以紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum* 026, CV026)为对照,分析食用菌发酵液的 QS 抑制效果,并通过试验证明其对铜绿假单胞菌的胞外蛋白酶和生物膜形成的影响。孙晓佳等<sup>[16]</sup>通过 GC-MS 试验发现,富马酸钠通过抑制荧光假单胞菌 AHLs 信号分子

收稿日期: 2023-05-22

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(U20A2067); 辽宁省自然科学基金博士科研启动基金计划项目(2022-BS-301)

第一作者: 崔方超,男,博士,副教授

通信作者: 励建荣 E-mail: lijr6491@163.com

李婷婷 E-mail: tingting780612@163.com

的分泌抑制了其腐败。然而,目前对莓实假单胞菌 QS 现象的研究还较少。本研究从腐败金枪鱼中分离出莓实假单胞菌,研究 QSI 对其 QS 现象的抑制情况及腐败现象。

草莓酸是一款既能散发草莓和苹果汁的香气,又带有坚果、焦糖和麦芽酚味道的纯天然有机酸食用香料,常被用于调配食用香精,也可制成酯类香料。有研究发现,草莓酸对黄曲霉有良好的抑菌作用,可以作为天然食品防腐剂<sup>[17]</sup>,而目前将其作为 QSI 的研究尚未发现。本研究通过探讨草莓酸对莓实假单胞菌 QS 现象的抑制作用,为水产品保鲜提供新的思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与试剂

莓实假单胞菌,由冷藏腐败金枪鱼中分离获得。生物报告菌株紫色杆菌(CV026)不释放 AHLs 信号分子,同时对卡那霉素具有抗性。当外源 AHLs ( $C_4$ -HSL、 $C_6$ -HSL、 $C_8$ -HSL)被引入后,该菌株会生成紫色素,其颜色变化可用于检测 AHLs 的产生情况。上述 2 种菌株均由渤海大学食品学院保藏。菌株均按体积比 1:100 接种于 LB 肉汤中 28 °C、160 r/min 摇床过夜培养。

草莓酸(纯度 99%)、卡那霉素,上海吉至生化科技有限公司;LB 液体、固体培养基,广州苏玛生物科技有限公司;十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS)、胰蛋白胨、蛋白胨、PBS 缓冲液,深圳市益百顺科技有限公司;结晶紫、脱脂奶粉,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;琼脂粉,上海源叶生物科技有限公司; $C_4$ -HSL、 $C_6$ -HSL、 $C_8$ -HSL、 $C_{10}$ -HSL、 $C_{12}$ -HSL、 $C_{14}$ -HSL,美国 Sigma 公司;其它试剂均为分析纯级。

### 1.2 仪器与设备

DILITCEN 22 离心机,苏州贝锐仪器有限公司;Imark 酶标仪,美国 Bio-Rad 公司;HZQ-X300C 型恒温振荡器,上海一恒科技有限公司;UV-2700 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;Bioscreen 微生物生长曲线分析仪,上海谓载科技有限公司;Accuri C6 Plus 流式细胞仪,美国 BD 公司;S-4800 场发射扫描电镜,日本日立公司;LabRAM HR Evolution 拉曼光谱仪,上海 HORIBA Scien-

tific 公司;7890N/5975 气相色谱-质谱联用仪,美国 Agilent 公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 草莓酸 MIC 的测定及 QS 抑制效果的确定

根据吴雅萍等<sup>[18]</sup>的研究方法进行适当调整。使用牛津杯法测算草莓酸的最小抑制浓度。按体积比 1:100 在 LB 肉汤中分别接种菌株 CV026 和莓实假单胞菌进行活化,160 r/min 的恒温摇床上培养活化 2 次。然后将其接种在 LB 琼脂中,凝固后使用牛津杯打孔。不同质量浓度(0~5.0 mg/mL)的草莓酸溶液分别加入孔中,于恒温培养箱中静置 2 d,观察菌落的生长情况,测量抑菌圈的直径。以去离子水作为空白对照。

将菌株 CV026 按体积比 1:100 接种在 LB 肉汤中进行活化,160 r/min 的恒温摇床上培养。连续活化 2 次后接种在 LB 琼脂中,加入信号分子后倒入培养皿中,待凝固后用牛津杯打孔。取不同质量浓度(0.1,0.2,0.3,0.4 mg/mL)的草莓酸溶液各 200  $\mu$ L 加入孔中,恒温培养箱中静置 2 d,观察 CV026 的生长情况。

1.3.2 草莓酸对 CV026 紫色菌素产量的影响 参照许腾腾等<sup>[19]</sup>的方法,将经过 2 次活化的 CV026 细菌,按照体积比 1:100 加入到 LB 培养基中,加入草莓酸,控制终质量浓度分别为 0.1,0.2,0.3,0.4 mg/mL。使用去离子水作为空白对照组,160 r/min 的恒温摇床上培养 2 d。设置不添加 AHLs 的试验组,研究草莓酸对菌株 CV026 生长的影响。取 300  $\mu$ L 经过处理的菌液放入离心管中,加入 150  $\mu$ L 10 g/100 mL 的 SDS,振荡裂解 15 s,之后加入 600  $\mu$ L 正丁醇振荡 5 s 以提取 CV026。用离心机将混合物在 10 000 r/min 下离心 5 min,最后将 200  $\mu$ L 上清液加到 96 孔板中,在波长 595 nm 处测定上清液的光密度(Optical density, OD)。

1.3.3 草莓酸对莓实假单胞菌细胞凋亡的影响 利用流式细胞仪对莓实假单胞菌和添加不同浓度草莓酸菌株的细胞凋亡率进行分析<sup>[20]</sup>,取 25 mL 生长对数期的莓实假单胞菌菌悬液以 4 000 r/min 的速度离心 10 min,弃去上层清液保留底部菌体,用 0.1 mol/L 的 pH=7.4 的磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)将菌体悬起,清洗 2 次后离心。以草莓酸终质量浓度分别为 0.1,0.2,0.3,0.4

mg/mL 的菌悬液为处理组,未处理的菌悬液为空白组,使用碘化丙啶(Propidium iodide, PI, 0.1%)染液于 4 °C 避光染色 30 min, 1 h 内用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

#### 1.3.4 草莓酸对莓实假单胞菌 AHLs 产量的影响

以孙晓佳等<sup>[19]</sup>所述的方法为基础,制备 AHLs 的粗提液。在 200 mL LB 培养基中,将莓实假单胞菌按体积比 1:100 接种培养。160 r/min 下恒温培养,连续活化 2 次。加入草莓酸溶液使其终质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL, 在培养箱中培养 48 h。将处于对数生长期的莓实假单胞菌菌悬液在 5 000 r/min 下离心 20 min, 保留上清液。向其中添加等体积含 0.1% 冰乙酸的乙酸乙酯溶液,进行 40 min 的提取过程(每 5 min 摇晃 1 次),静置过夜。隔日,取乙酸乙酯层,加入适量无水硫酸钠,旋转蒸发仪中在 35 °C、真空度 0.1 MPa 的条件下蒸发乙酸乙酯,得到 AHLs 粗提液残留物,随后用甲醇将其溶解, -20 °C 下存放备用。制备 AHLs 标准品的步骤为:使用色谱级甲醇作为溶剂,制备质量浓度为 200 μg/mL 的 AHLs 混合标准溶液,包括 C<sub>4</sub>-HSL、C<sub>6</sub>-HSL、C<sub>8</sub>-HSL、C<sub>10</sub>-HSL、C<sub>12</sub>-HSL、C<sub>14</sub>-HSL。GC-MS 测定条件参考文献[21]。

#### 1.3.5 草莓酸对莓实假单胞菌生物被膜的影响

##### 1.3.5.1 草莓酸对莓实假单胞菌生物被膜形成量的影响

借鉴 Wei 等<sup>[22]</sup>和 Bouyahya 等<sup>[23]</sup>的方法,将经过 2 次活化的莓实假单胞菌接种到 LB 培养基中,接种比例为 1:100,将其液转移至 1.5 mL 的无菌离心管中,静态培养 48 h。使用酶标仪测量波长 595 nm 处的 OD 值,丢弃细菌悬液。无菌水清洗 3~5 次,在无菌超净工作台中风干 40 min,直到管壁完全干燥。取 1 mL 结晶紫(0.2 g/100 mL)加入附着着生物膜的管体中染色 15 min。随后用无菌水清洗约 3~5 次,直至无菌水呈无色干为止。待管身再次干燥后,用体积分数 33% 冰乙酸将固着在管身上的结晶紫染料溶解。通过酶标仪测定各处理组染液的光密度(OD)值,重复 3 次。生物被膜的相对形成量按式(1)计算。

$$\text{生物被膜相对形成率(\%)} = \frac{\text{处理组 OD}_{595\text{nm}}}{\text{阴性对照组 OD}_{595\text{nm}}} \times 100 \quad (1)$$

##### 1.3.5.2 草莓酸对莓实假单胞菌生物被膜形态的

影响 参照赵朵等<sup>[24]</sup>的方法,按照体积比为 1:100 的比例将经两次过夜活化的莓实假单胞菌接种于含有 20 mL 灭菌 LB 肉汤的无菌培养皿中,而后向其中加入 10 mm×10 mm 大小经抛光打磨去除氧化层并且灭菌的锌片,28 °C 下培养 48 h。将培养结束的锌片取出,用无菌水轻轻冲洗 3 次,去除表面浮菌后用风干,4 °C 下预先冷却的质量分数 2.5% 戊二醛中浸泡,持续 2 h 以固定生物被膜,随后使用 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 的乙醇溶液进行梯度洗脱。接下来用无水乙醇脱水,以及乙酸异戊酯置换,最后进行干燥处理。对处理后的生物被膜进行喷金,并使用扫描电镜观察各试验组的生物被膜形态,分别以添加去离子水和信号分子的为空白和阳性对照。

##### 1.3.6 草莓酸对莓实假单胞菌胞外蛋白

根据 Lee 等<sup>[25]</sup>的方法,在 LB 肉汤中以体积比 1:100 接种莓实假单胞菌,28 °C, 160 r/min 条件下进行 2 次连续活化。活化完成后,加入预先配制好的草莓酸溶液,最终质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL,并持续在摇床上培养 2 d。将牛奶琼脂倒入带有牛津杯的培养皿中,凝固后向孔中加入 200 μL 上述菌液。在培养箱中静置 2 d。观察菌株在培养过程中的变化,同时测定透明菌圈的直径。设置加入去离子水和信号分子的空白对照和阳性对照。

##### 1.3.7 草莓酸对莓实假单胞菌胞外聚合物的影响

利用拉曼光谱(Raman Spectrum, RS)<sup>[26]</sup>扫描分析莓实假单胞菌和添加不同质量浓度草莓酸(0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL)的菌株的胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)产生情况的差异。将固着有生物被膜的锌片用 PBS 缓冲液清洗 3~5 次,去除浮菌后无菌风烘干 30 min 直至表面干燥无水,随后进行拉曼光谱扫描。以添加去离子水和信号分子为空白和阳性对照。

##### 1.3.8 草莓酸对莓实假单胞菌运动性的影响

参照文献[27]的方法制备群集和游动培养基,然后添加预先配制好的草莓酸溶液,控制终质量浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL,并混合均匀后倒入培养皿中。凝固后,取 5 μL 活化 2 次的莓实假单胞菌悬液,加入到含有不同质量浓度草莓酸的群集和游动培养基的中央,晾干后培养在常温培养箱中培养 2 d,然后测定其运动迁移的直径。设定

加入去离子水和信号分子的空白的对照组和阳性对照组。

#### 1.4 数据分析

所有试验数据均经过3次以上检验,试验数据=均数±标准差。采用IBM SPSS统计学进行统计分析。采用单因素分析,作图采用Origin2019。

## 2 结果与讨论

### 2.1 草莓酸最小抑菌浓度及 QS 抑制效果的确定

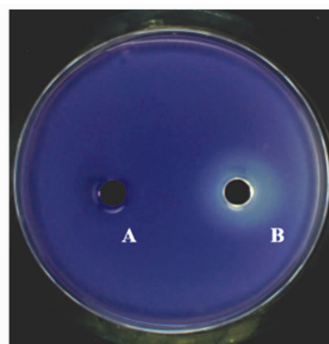
通过观察不同质量浓度的草莓酸处理紫色菌株 CV026 及莓实假单胞菌的生长情况,发现草莓酸在抑制莓实假单胞菌生长方面的最小抑菌浓度为 0.5 mg/mL,由图 1 所示,孔中加入 0.5 mg/mL 草莓酸处理紫色菌株,可以观察菌株周围出现白色、不透明的抑菌圈,证实 0.5 mg/mL 的草莓酸加入影响到紫色菌素产生,但菌株的生长未被抑制。草莓酸的加入干扰紫色菌株 CV026 的 QS 系统。选择 0.5 mg/mL 的草莓酸加入莓实假单胞菌菌株,观察莓实假单胞菌的菌株生长并未受到抑制,因此,选择亚抑菌浓度为 0.1,0.2,0.3,0.4 mg/mL 进行后续试验。

### 2.2 草莓酸对紫色菌株 CV026 的影响

由图 2 可知,草莓酸没有影响紫色菌株 CV026 的生长,亚抑菌浓度下,紫色菌素产量随着草莓酸质量浓度的升高而降低,相较于未经处理的对照组,添加质量浓度 0.4 mg/mL 草莓酸的处理组导致紫色菌素的产量减少 74.1%。研究结果显示,在亚抑菌浓度下,加入草莓酸后会干扰 CV026 的 QS 系统,由此影响了紫色菌素的生成,而菌株的生长未被抑制。

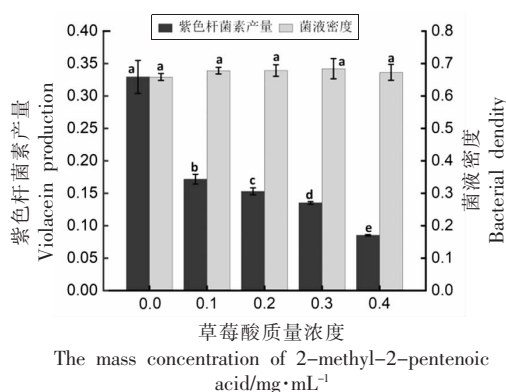
### 2.3 草莓酸对莓实假单胞菌细胞凋亡的影响

利用 PI 染色法鉴定细胞凋亡情况<sup>[28]</sup>。图 3a 为未添加草莓酸的对照组,细胞存活率为 99.3%,细胞死亡率为 0.3%,细胞凋亡率为 0.4%,因此未经过草莓酸处理的莓实假单胞菌的存活率较高。经亚抑菌浓度的草莓酸处理的莓实假单胞菌,随着草莓酸质量浓度的增大,细胞存活率分别为 97.3%,98.9%,99.6%,99.1%,与对照组相比没有较大变化,说明草莓酸不是直接破坏菌体细胞,致使细胞坏死,而是通过抑制莓实假单胞菌的 QS 系统起到抑菌效果。



注:A. 去离子水,B. 草莓酸(0.5 mg/mL)。

图 1 草莓酸对 CV026 产紫色菌素的抑制能力  
Fig.1 Inhibitory capacity of 2-methyl-2-pentenoic acid against violacein production in CV026



注:不同小写字母表示差异显著, $P<0.05$ 。

图 2 草莓酸对 CV026 菌株菌液密度和紫色杆菌素产生量的影响

Fig.2 Effects of 2-methyl-2-pentenoic acid on bacterial density and violacein production of CV026

### 2.4 草莓酸对莓实假单胞菌 AHLs 产量的影响

图 4 为 6 种 AHL 以及莓实假单胞菌信号分子 GC-MS 检测结果图。图中可以看出有 6 个分离效果良好,形状尖锐的峰,而各峰从左开始依次代表 C<sub>4</sub>-HSL、C<sub>6</sub>-HSL、C<sub>8</sub>-HSL、C<sub>10</sub>-HSL、C<sub>12</sub>-HSL、C<sub>14</sub>-HSL,所有 AHLs 在设定时间内均完全分离,保留时间分别为 3.629,5.318,7.237,9.422,11.951,14.899 min。通过对图 4 中莓实假单胞菌信号分子 GC-MS 检测图与标品检测图进行对比分析得出,其分泌的信号分子保留时间为 7.237 min 和 9.526 min,由此确定其为 C<sub>8</sub>-HSL 以及 C<sub>10</sub>-HSL。图 5 表示添加不同质量浓度的草莓酸到 C<sub>8</sub>-HSL 混合液中,随着草莓酸质量浓度的增长,C<sub>8</sub>-

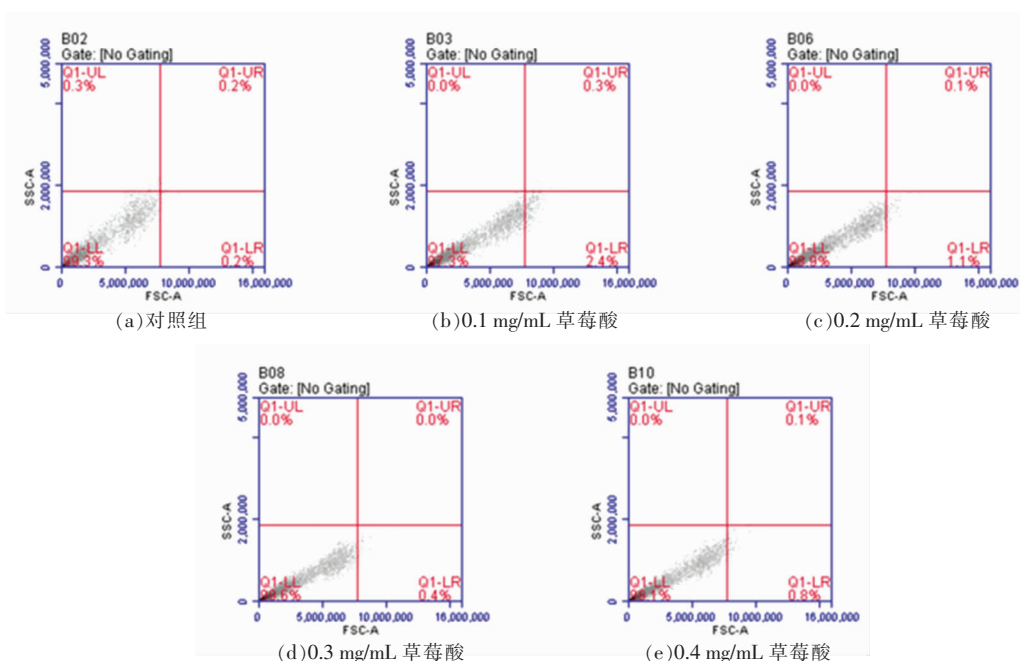
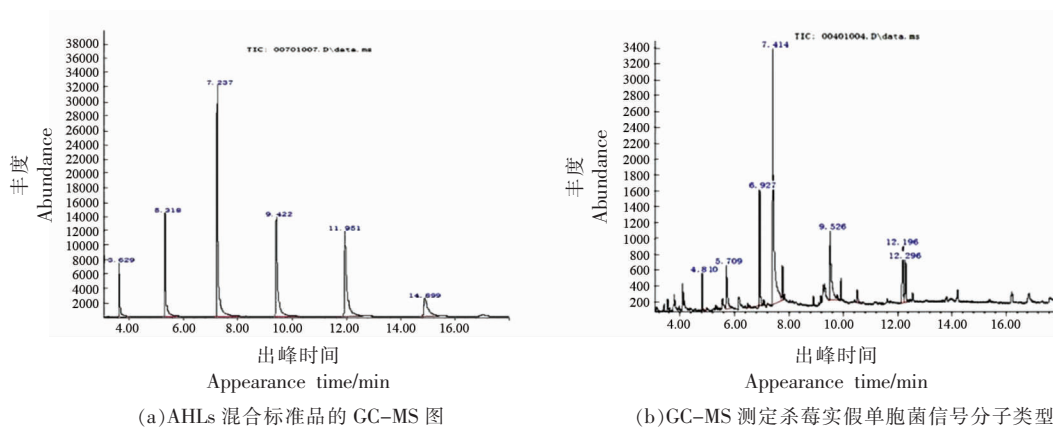


图 3 草莓酸对莓实假单胞菌细菌凋亡率的影响

Fig.3 Effects of 2-methyl-2-pentenoic acid on apoptosis rate of *P. fragi*



(a) AHLs 混合标准品的 GC-MS 图

(b) GC-MS 测定杀莓实假单胞菌信号分子类型

图 4 AHLs 混合标准品以及莓实假单胞菌的 AHLs 粗提液 GC-MS 检测图

Fig.4 GC-MS diagram of AHLs mixed standard and *P. fragi*

HSL 的峰面积逐渐减少。由此证明草莓酸可以抑制莓实假单胞菌分泌的长链 AHLs 信号分子。

## 2.5 草莓酸对莓实假单胞菌生物被膜的影响

### 2.5.1 草莓酸对莓实假单胞菌生物被膜形成量的影响

生物被膜是细菌在自然界中为了适应生态环境在物体或活性组织表面的一种生长方式,特别是当细菌处于恶劣环境中的一种生存本能。细菌在感受到外面的不利因素时,环境信号应答系统会开启,胞内特定基因的表达或调控某些调控

因子的转录水平会被激活,从而增加了 EPS 的分泌,以增强细菌的黏附性。一旦黏附在一起的细菌数量达到一定程度,便能触发 QS,细菌会通过释放信号分子来进行胞外交流,以此来调控整个细菌群体的状态<sup>[29]</sup>。由图 6 可知,在亚抑菌浓度下,草莓酸质量浓度升高会导致莓实假单胞菌生物被膜形成量降低,这证明草莓酸具有抑制假单胞菌生物被膜形成的能力。与未添加草莓酸的对照组相比,添加 0.4 mg/mL 草莓酸的莓实假单胞菌生

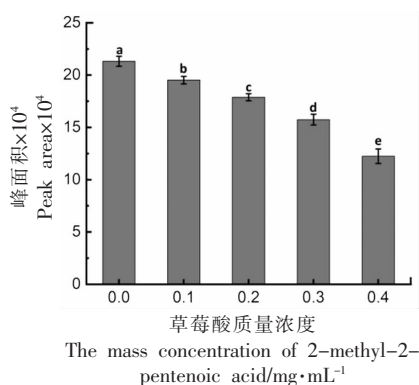


图5 草莓酸对莓实假单胞菌 C<sub>8</sub>-HSL 产量的影响

Fig.5 Effects of 2-methyl-2-pentenoic acid on the production of C<sub>8</sub>-HSL from *P. fragi*

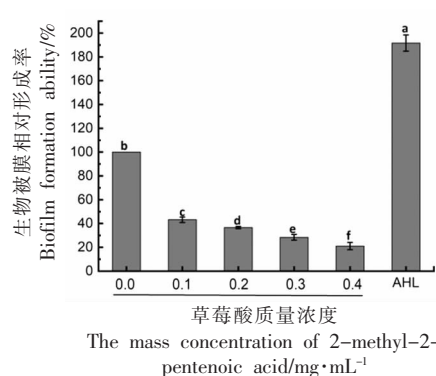


图6 草莓酸对莓实假单胞菌生物被膜形成率的影响

Fig.6 Effects of 2-methyl-2-pentenoic acid on biofilm formation of *P. fragi*

物被膜的生成。生物被膜的形成率降至了 21.06%，而添加信号分子 AHL 的阳性对照显示，其生物被膜形成率高达 191.67%。这个结果表明，草莓酸可以透过莓实假单胞菌的 QS 系统影响生物被膜的形成率。

2.5.2 草莓酸对莓实假单胞菌生物被膜形态的影响 图 7 为经不同质量浓度草莓酸处理的莓实假单胞菌形成的生物被膜的扫描电子显微镜图。图 7b 为空白对照，可以看出结构致密、厚度高；图 7a

为阳性对照，生物被膜覆盖高，有一定的堆叠现象；其中图 7c~7f 分别为经质量浓度 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 mg/mL 的草莓酸处理后莓实假单胞菌生物被膜的形态，随着草莓酸质量浓度的增加，莓实假单胞菌生物被膜形成量逐渐减少，当草莓酸质量浓度达到 0.4 mg/mL 时，生物被膜的形成受到最大的破坏，且结构简单。以上结果说明，草莓酸能控制莓实假单胞菌生物被膜的生成。

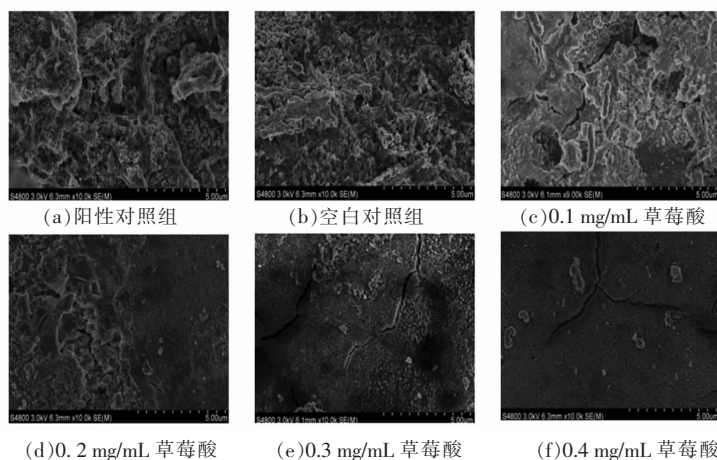


图7 草莓酸对莓实假单胞菌生物被膜形态的影响

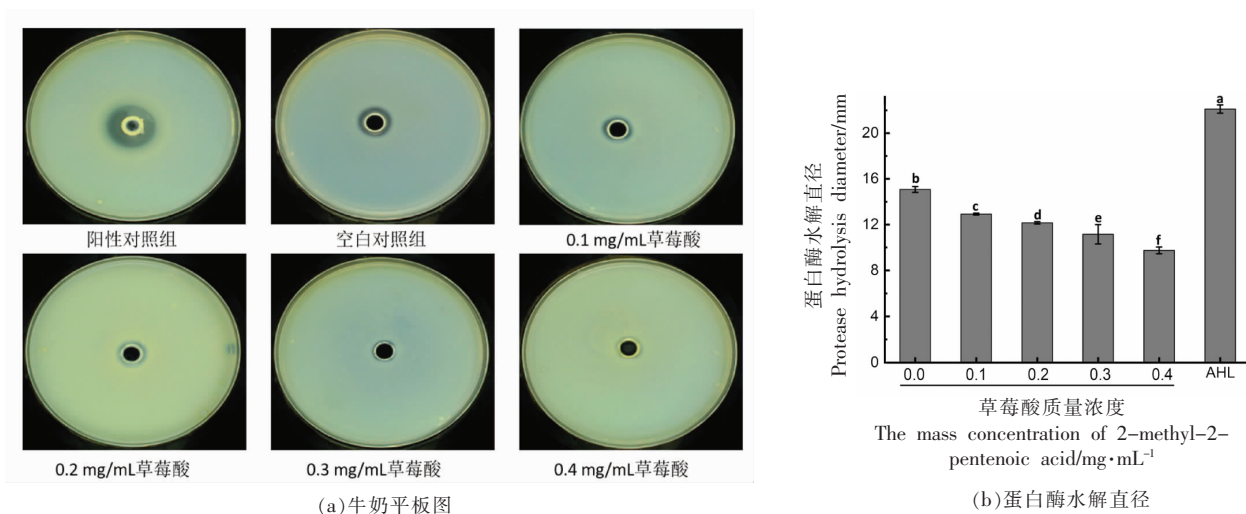
Fig.7 Effects of 2-methyl-2-pentenoic acid on biofilm morphology of *P. fragi*

## 2.6 草莓酸对莓实假单胞菌胞外蛋白酶活性的影响

由图 8 可以看出，在亚抑菌浓度下，随着草莓酸质量浓度的升高，胞外蛋白酶水解圈直径减少。

然而，添加了外源信号分子的阳性对照与空白对照相比直径大大增加。牛慧超等<sup>[30]</sup>发现 1,10-癸二醇可以抑制杀鲑气单胞菌胞外蛋白酶的产生。可推断，莓实假单胞菌胞外蛋白酶的活性受到由

AHLs 介导的群体感应系统的调节,且草莓酸可以胞外蛋白酶的活性。通过对莓实假单胞菌群体感应系统的影响而改变



注:AHL 为添加信号分子 C<sub>8</sub>-HSL 的阳性对照组。

图 8 草莓酸对莓实假单胞菌胞外蛋白酶活性的影响

Fig.8 Effects of 2-methyl-2-pentenoic acid on extracellular protease activity of *P. fragi*

2.7 草莓酸对莓实假单胞菌胞外聚合物的影响

EPS 是由多糖、蛋白质和脂肪酸等高分子物质组成,位于胞外和细胞间,参与细菌生物聚集体的形成的有机生物大分子的总称,并且与细菌的胞内成分类似<sup>[31]</sup>。图 9 为不同质量浓度草莓酸对

莓实假单胞菌分泌 EPS 的拉曼光谱图。图中 9a~9f 显示,菌株均在 1 347 cm<sup>-1</sup> 和 1 600 cm<sup>-1</sup> 处出现拉曼振动峰,峰值的高、低与 EPS 形成量呈现正相关关系,峰值越高,EPS 形成量越高。在亚抑菌浓度下,随着草莓酸质量浓度的升高,峰值逐渐降低,

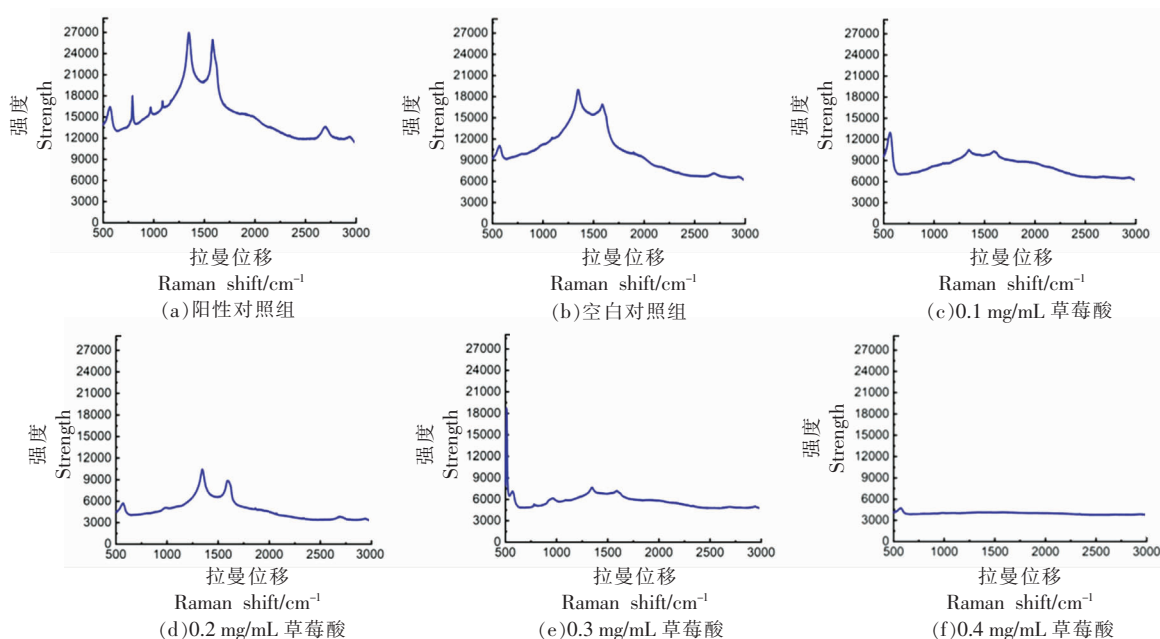


图 9 草莓酸对莓实假单胞菌胞外聚合物的影响

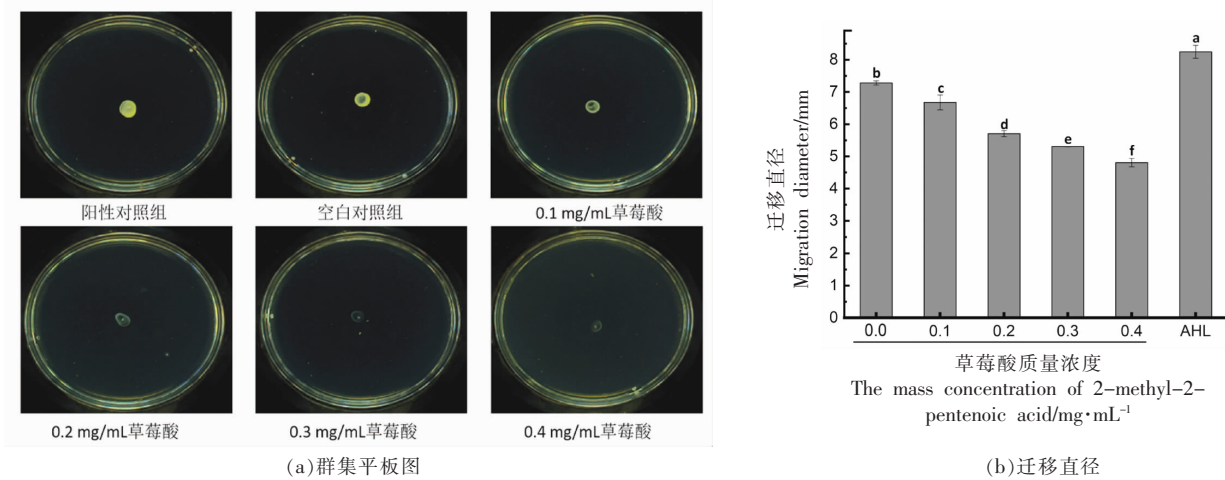
Fig.9 The effects of 2-methyl-2-pentenoic acid on EPS of *P. fragi*

EPS 形成量越少。然而,外源信号分子的加入同样使得 EPS 的产量增加,说明该性状受到 QS 系统的调控。此外,由于 EPS 是生物被膜的组成成分和营养基质,因此 EPS 分泌量的减少也是导致生物被膜形成量下降的原因。这与草莓酸对莓实假单胞菌生物被膜形态量的研究结果一致。

### 2.8 草莓酸对莓实假单胞菌群集和泳动的影响

运动性是细菌的重要微生物生理学特征之一,根据细菌所处环境的湿润度以及鞭毛依赖程度等特性,可将细菌的运动分为群集、泳动等<sup>[32]</sup>。

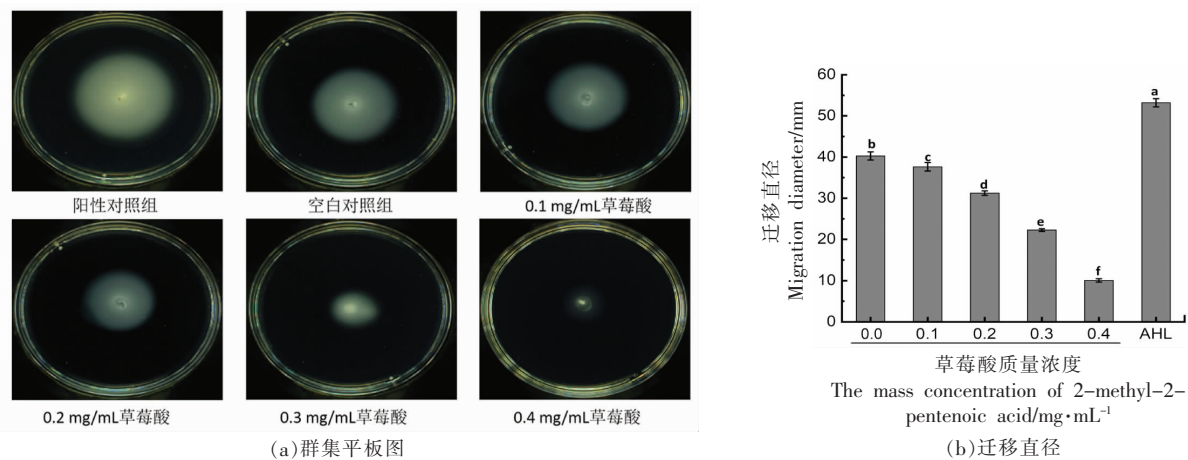
图 10 和 11 中表明,在亚抑菌浓度下,随着草莓酸质量浓度的升高,草莓酸质量浓度与莓实假单胞菌的群集和泳动迁移直径呈现负相关关系。当草莓酸质量浓度为 0.4 mg/mL 时,莓实假单胞菌的群集和泳动能力相较于阴性对照降低了 34.06% 和 75.02%,莓实假单胞菌目前的运动能力十分有限,然而经过信号分子的引入后,群集和泳动的迁移直径显著增大。王俊淇等<sup>[33]</sup>的研究证明亚抑菌浓度的脱氢乙酸钠能抑制杀鲑气单胞菌 Y12 的群集和泳动能力,与本文的研究结果一致。



注:AHL 为添加信号分子 C<sub>8</sub>-HSL 的阳性对照组。

图 10 草莓酸对莓实假单胞菌群集的影响

Fig.10 Effects of 2-methyl-2-pentenoic acid on swarming motility of *P. fragi*



注:AHL 为添加信号分子 C<sub>8</sub>-HSL 的阳性对照组。

图 11 草莓酸对莓实假单胞菌泳动的影响

Fig.11 Effects of 2-methyl-2-pentenoic acid on swimming motility of *P. fragi*



### 3 结论

本研究通过测定草莓酸对莓实假单胞菌最小抑菌浓度,探究在亚抑菌浓度下草莓酸对金枪鱼优势腐败菌莓实假单胞菌QS的抑制性及其腐败的控制结果。通过GC-MS研究发现,莓实假单胞菌分泌的QS信号分子为C<sub>8</sub>-HSL和C<sub>10</sub>-HSL,并且草莓酸对其有抑制作用,结合在亚抑菌浓度下草莓酸对莓实假单胞菌的细胞凋亡率没有较大的影响,确定草莓酸是通过抑制莓实假单胞菌的QS系统起到抑菌效果。同时通过对细菌生物被膜形成、胞外聚合物的生成、细菌运动性等QS腐败表型的抑制性,进一步发现草莓酸对QS现象起到抑制作用。综上所述,草莓酸具有很好的QS抑制性,这种新型水产保鲜剂以QS为靶点,具有安全高效的特性,以此拓宽草莓酸的应用范围。

### 参 考 文 献

- [1] 许玉彬,张颖,王森,等. 细菌群体感应研究进展[J]. 河南农业科学, 2013, 42(12): 16-19.  
XU Y B, ZHANG Y, WANG M, et al. Research progress of bacterial quorum sensing[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2013, 42(12): 16-19.
- [2] ANNE M, CHRISTINA K, JUDITH P V. Using G-functions to investigate the evolutionary stability of bacterial quorum sensing[J]. Mathematics, 2019, 7(11): 23-38.
- [3] NELSON K H, HASTINGS J W. Bacterial bioluminescence: Its control and ecological significance[J]. Microbiological Reviews, 1979, 43(4): 496-517.
- [4] KIEVIT T R D, IGLEWSKI B H. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships[J]. Infection & Immunity, 2000, 68(9): 4839.
- [5] HORNG Y T, DENG S C, DAYKIN M, et al. The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*[J]. Molecular Microbiology, 2002, 45(6): 1655-1671.
- [6] WHISTLER C A. Repression of phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens* strain 30-84 by RpeA[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(13): 3718-3725.
- [7] 姜巨全,肖鸿禹,胡宝忠. 细菌群体感应分子水平调控机制研究进展[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2013, 30(2): 232-238.  
JIANG J Q, XIAO H Y, HU B Z. Research progress on molecular level regulation mechanism of bacterial quorum sensing[J]. Journal of Natural Science of Heilongjiang University, 2013, 30(2): 232-238.
- [8] 丁婷,李婷婷,王当丰,等. 水产品腐败菌群体感应系统及群体感应抑制剂研究进展[J]. 生物加工过程, 2019, 17(3): 227-235.  
DING T, LI T T, WANG D F, et al. Research progress of quorum-sensing system and quorum-sensing inhibitors of spoilage bacteria in aquatic products[J]. Bioprocessing Processes, 2019, 17(3): 227-235.
- [9] 冯闪,杨莹莹,马陇豫,等. 细菌群体感应及其抑制剂的研究进展[J]. 河南大学学报(医学版), 2021, 40(4): 305-312.  
FENG S, YANG Y Y, MA L Y, et al. The research progress of bacterial quorum sensing and its inhibitors[J]. Journal of Henan University (Medical Edition), 2021, 40(4): 305-312.
- [10] GRAM L, DALGAARD P. Fish spoilage bacteria-problems and solutions[J]. Current Opinion Biotechnol, 2002, 13(3): 262-266.
- [11] 朱彦祺,郭全友,李保国,等. 不同温度下腐败希瓦氏菌(*Shewanella putrefaciens*)生长动力学模型的比较与评价[J]. 食品科学, 2016, 37(13): 147-152.  
ZHU Y Q, GUO Q Y, LI B G, et al. Comparison and evaluation of growth kinetics models of *Shewanella putrefaciens* at different temperatures[J]. Food Science, 2016, 37(13): 147-152.
- [12] DALGAARD P. Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish[J]. International Journal of Food Microbiol, 1995, 26(3): 319-333.
- [13] GANESH P S, RAI V R. Evaluation of anti-bacterial and anti-quorum sensing potential of essential oils extracted by supercritical CO<sub>2</sub> method against *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 2015, 18(2): 264-275.
- [14] 刘佳宜,李婷婷,励建荣,等. 乙基麦芽酚对杀链气单胞菌群体感应及腐败活性的抑制作用[J]. 食品科学, 2021, 42(17): 27-33.  
LIU J Y, LI T T, LI J R, et al. Effects of ethyl

- maltol on quorum sensing and spoilage activity of *Aeromonas salmonicidas*[J]. Food Science, 2021, 42(17): 27-33.
- [15] 陈敏, 梁馨云, 文秋嘉, 等. 食用菌发酵液对铜绿假单胞菌生长和生物膜形成的影响[J]. 中国药物经济学, 2022, 17(5): 114-116.
- CHEN M, LIANG X Y, WEN Q J, et al. Effects of edible fungus fermentation broth on growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Economics, 2022, 17(5): 114-116.
- [16] 孙晓佳, 李婷婷, 赫彬彬, 等. 富马酸钠对荧光假单胞菌群体感应现象及其腐败活性的抑制作用[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 7-13.
- SUN X J, LI T T, HE B B, et al. Inhibitory effect of sodium fumarate on quorum sensing and spoilage capacity of *Pseudomonas fluorescens*[J]. Food Science, 2019, 40(11): 7-13.
- [17] 马卫宾, 张迪, 谢岩黎, 等. 天然食用香料草莓酸对黄曲霉的抑菌作用研究[J]. 粮油食品科技, 2020, 28(5): 6-10.
- MA W B, ZHANG D, XIE Y L, et al. Natural edible flavor of strawberry acid of *Aspergillus flavus* bacteriostasis research[J]. Journal of Grain and Oil Food Science and Technology, 2020, 28(5): 6-10.
- [18] 吴雅萍, 江晓佟, 张帅, 等. 乳链球菌素最小抑菌浓度(MIC)测定及理化性质分析[J]. 中国食品添加剂, 2020, 31(5): 119-123.
- WU Y P, JIANG X T, ZHANG S, et al. Nisin minimum inhibitory concentration (MIC) determination and its physicochemical property[J]. China Food Additives, 2020, 31(5): 119-123.
- [19] 许腾腾, 赵慧娟, 刘尊英. 连翘提取物对嗜水气单胞菌群体感应系统的影响[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 256-269.
- XU T T, ZHAO H J, LIU Z Y. St John's wort with thermophilic moisture quorum-sensing system influence bacterium [J]. Journal of Microbiology, 2022, 49(1): 256-269.
- [20] 李可欣, 吴蔓莉, 高欢, 等. 基于流式细胞术的活性多环芳烃降解菌检测技术[J]. 分析化学, 2021, 49(8): 1357-1365.
- LI K X, WU M L, GAO H, et al. Based on the activity of flow cytometry path degradation bacteria detection technology[J]. Journal of Analytical Chemistry, 2021, 49(8): 1357-1365.
- [21] 杨兵. 冷藏大菱鲆优势腐败菌群体感应 AHLs 鉴定及对水产品腐败特性的调控[D]. 锦州: 渤海大学, 2016.
- YANG B. Identification of dominant spoilage bacteria by quorum sensing AHLs and regulation of spoilage characteristics of aquatic products in refrigerated turbid[D]. Jinzhou: Bohai University, 2016.
- [22] WEI L N, SHI C Z, LUO C X, et al. Phloretin inhibits biofilm formation by affecting quorum sensing under different temperature[J]. LWT, 2020, 131(1): 1-26.
- [23] BOUYAHYA A, ABRINI J, DAKKA N, et al. Essential oils of *Origanum compactum* increase membrane permeability, disturb cell membrane integrity, and suppress quorum-sensing phenotype in bacteria [J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 9(5): 301-311.
- [24] 赵朵, 肖娜, 裴曼君, 等. 金黄色葡萄球菌生物被膜形成及检测方法研究[J]. 教育教学论坛, 2020(47): 388-390.
- ZHAO D, XIAO N, PEI M J, et al. Research on the formation and detection methods of *Staphylococcus aureus* biofilm [J]. Education Teaching Forum, 2020(47): 388-390.
- [25] LEE J H, PARK J H, CHO H S, et al. Antibiofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus* [J]. Biofouling, 2013, 29(5): 491-499.
- [26] HAN N, MIZAN M F R, JAHID I K, et al. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature[J]. Food Control, 2016, 70: 161-166.
- [27] ZHANG J M, LI X R, WANG Y, et al. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation[J]. Food Control, 2014, 42(8): 125-131.
- [28] LI W, HE J L, XIE L X, et al. Comparative genomic insights into the biosynthesis and regulation of mycobacterial siderophores[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2013, 31(1): 1-13.
- [29] 马悦, 吴梦洁, 李卓思, 等. 食品接触表面生物被膜形成机制及防控方法研究进展[J]. 食品科学, 2023, 44(7): 276-285.
- MA Y, WU M J, LI Z S, et al. Research progress of biofilm formation mechanism and control methods on food contact surface[J]. Food Science, 2023, 44

- (7): 276–285.
- [30] 牛慧超, 李婷婷, 刘景云, 等. 1, 10-癸二醇对杀鲑气单胞菌群体感应的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 65–70.
- NIU H C, LI T T, LIU J Y, et al. Inhibitory effect of 1,10-decanediol on quorum sensing of *Aeromonas salmon*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 65–70.
- [31] COSTA O, RAAIJMAKERS J M, KURAMAE E E. Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1636–1650.
- [32] 渠宏雁, 李学鹏, 孟良玉, 等. 抑制剂对副溶血性弧菌运动性的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(5): 480–485.
- QU H Y, LI X P, MENG L Y, et al. Effect of inhibitors on the motilities of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2014, 33(5): 480–485.
- [33] 王俊淇, 李婷婷, 刘佳宜, 等. 脱氢乙酸钠对杀鲑气单胞菌群体感应现象的抑制[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(17): 69–75.
- WANG J Q, LI T T, LIU J Y, et al. Dehydroacetic acid sodium semeai salmon gas unit cell inhibition of bacterial quorum sensing phenomenon [J]. Journal of Food and Fermentation Industry, 2021, 47(17): 69–75.

### Inhibitory Effects of 2-Methyl-2-pentenoic Acid on Quorum Sensing of *Pseudomonas fragi*

Cui Fangchao<sup>1</sup>, Wang Qianqian<sup>1</sup>, Liu Jiayi<sup>1</sup>, Wang Dangfeng<sup>1</sup>, Tan Xiqian<sup>1</sup>,  
Li Qiuying<sup>1</sup>, Li Jianrong<sup>1\*</sup>, Li Tingting<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>College of Food Science and Engineering, Bohai University, National & Local Joint Engineering Research Center of Storage, Processing and Safety Control Technology for Fresh Agricultural and Aquatic Products, China Light Industry Key Laboratory of Marine Fish Processing, Jinzhou 121013, Liaoning

<sup>2</sup>College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning)

**Abstract** In order to investigate the quorum-sensing inhibition of 2-methyl-2-pentenoic acid and its quorum-sensing effect on *Pseudomonas fragi* by using the reporter strain *Chromobacterium violaceum* 026 (CV026). The inhibition effect of 2-methyl-2-pentenoic acid on the population induction of *P. fragi* was analyzed by bacterial apoptosis rate, gas chromatography-mass spectrometry analysis, biofilm inhibition effect, the amount of extracellular polymer formed, bacterial swarming and swimming. It was demonstrated that the minimum inhibitory concentration of 2-methyl-2-pentenoic acid was 0.5 mg/mL, and 2-methyl-2-pentenoic acid could reduce the ability of CV026 to produce purple bacteriocin at sub-inhibitory concentration and did not affect the apoptosis. The population-sensing signal molecules C<sub>8</sub>-HSL and C<sub>10</sub>-HSL produced by *P. fragi* were detected quantitatively by gas chromatography-mass spectrometry, and 2-methyl-2-pentenoic acid had an inhibitory effect on the secretion of the produced signal molecules. The biofilm formation of *P. fragi* by subinhibitory concentration 2-methyl-2-pentenoic acid was 21.06%, and the inhibition of bacterial swarming and swimming was reduced by 34.06% and 75.02%, respectively, in a concentration-dependent manner. In conclusion, 2-methyl-2-pentenoic acid had good population induction inhibitory property and could be used as a population induction inhibitor in aquatic preservation.

**Keywords** 2-methyl-2-pentenoic acid; *Pseudomonas fragi*; quorum sensing; inhibitors