

AHLs 对不同菌株产生物胺的影响及 菌株生物被膜特性分析

陆静, 卢士玲, 刘玉晗, 蒋彩虹, 王少梅
(石河子大学食品学院, 新疆石河子 832000)

摘要: 本文选取新疆熏马肠中产生物胺优势菌克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌、成团泛菌作为研究对象, 根瘤农杆菌 A136 平行线法检测信号分子, 现象表明 3 株优势菌均能发生群体感应现象。AHLs 活性检测、生物胺检测及 β -半乳糖苷酶活力与生物胺相关性分析, 结果表明: 克雷伯氏菌、成团泛菌的 β -半乳糖苷酶活力与腐胺、尸胺、组胺、酪胺均显著相关 (R_{Person} 均在 0.817 之上, $P < 0.01$); 阴沟肠杆菌 β -半乳糖苷酶活力与尸胺显著相关 ($R_{Person}=0.923$, $P=0.00 < 0.01$); 因此, AHLs 分泌影响生物胺累积, 具有协同作用。通过 28 °C、37 °C 生物被膜试验、细胞疏水性试验, 结果表明: 3 株优势菌对二甲苯、三氯甲烷、乙酸乙酯吸附能力不同, 细胞疏水值均不同; 克雷伯氏菌形成生物被膜的能力差异不显著 ($P=0.095 > 0.05$), 阴沟肠杆菌、成团泛菌形成被膜的能力差异显著 ($P=0.0315 < 0.05$, $P=0.047 < 0.05$)。因此, 细胞疏水性能、培养时间、温度影响优势菌生物被膜形成。

关键词: 群体感应 N-酰基高丝氨酸内酯; 生物胺; 生物被膜

文章编号: 1673-9078(2014)10-88-95

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.016

Effect of N-acylhomoserine Lactones on Biogenic Amine Production from Bacteria and Analysis of Biofilm Formation Characteristics

LU Jing, LU Shi-ling, LIU Yu-han, JIANG Cai-hong, WANG Shao-mei
(College of Food Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: In this study, *Klebsiella* spp., *Enterobacter cloacae*, and *Pantoea agglomerans*, which are dominant biogenic amine-producing bacteria in smoked and fermented horsemeat sausages, were used as test strains; quorum-sensing compounds were detected by a parallel line assay of *Agrobacterium tumefaciens* A136, and experimental evidence showed that quorum sensing was observed in all three of the dominant strains. N-acylhomoserine lactone (AHL) activity assay, detection, and quantification of biogenic amines, as well as correlation analysis between β -galactosidase activity and biogenic amines were conducted. The results indicated that both *Klebsiella* spp. and the β -galactosidase activity in *P. agglomerans* showed a significant positive correlation ($R_{Person} > 0.817$, $P < 0.01$) with putrescine, cadaverine, histamine, and tyramine. The β -galactosidase activity in *E. cloacae* was significantly correlated with cadaverine (R_{Person} is 0.923, $P = 0.00 < 0.01$). In addition, the secretion of AHLs affected the accumulation of biogenic amines, showing a synergistic effect. Meanwhile, biofilm formation and cell hydrophobicity experiments were carried out at 28 °C and 37 °C, respectively. The results indicated that the absorption capacities of xylene, chloroform, and ethyl acetate, as well as cell hydrophobicity values were different for the three dominant strains. Furthermore, the ability of *Klebsiella* spp. to form biofilms did not show significant difference ($P = 0.095 > 0.05$), while significant differences ($P = 0.0315 < 0.05$, $P = 0.047 < 0.05$) were observed for *E. cloacae* and *P. agglomerans*. Therefore, cell hydrophobicity, incubation time, and temperature affected the ability of the dominant bacteria to form biofilms.

Key words: quorum sensing; N-acylhomoserine lactones; biogenic amines; biofilm

生物胺是一类含氮脂肪族、芳香族或杂环类有机

收稿日期: 2014-05-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31360392); 国家自然科学基金资助项目 (31160329); 新疆生产建设兵团博士基金 (2013BB012)

作者简介: 陆静 (1987-), 女, 硕士在读, 研究方向: 畜产品加工

通讯作者: 卢士玲 (1976-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 畜产品加工与质量安全

化合物, 对动植物、微生物活性细胞有重要的生理功能, 调节核酸与蛋白质合成。生物胺普遍存在于食品中, 如奶酪、海产品、发酵肉制品等, 生物胺主要存在于蛋白质含量丰富的发酵肉制品中。生物胺是世界范围内公认的潜在的食品安全问题。实验室调查源自新疆伊犁、石河子等地区的熏马肠中生物胺总量超过 FDA 限量标准, 色胺、酪胺和亚精胺超过安全用量标

准^[1]。因此,必须对熏马肠中生物胺含量进行控制。

细菌在生长环境中会产生、释放由 S-腺苷甲硫氨酸和 acyl-ACP 为底物合成的小分子物质,该小分子物质称为自体诱导物(autoinducers, AI),AI 分泌达到一定浓度阈值时,细菌可监测到周围环境变化,调控相关基因的表达。Fuqua 等根据这一现象提出群体感应(quorum sensing, QS)概念^[2]。革兰氏阴性菌 AI 是 N-酰基高丝氨酸内酯(N-acylhomoserine lactones, AHLs),AHLs 由可变的酰基链尾部和稳定的高丝氨酸内酯头部相连构成,AHLs 结构差异为酰基碳链长度(4-18 个碳)及酰基碳链 C-3 位上的功能基团。由于 AHLs 浓度极低,通常采用对扩散性信号分子 AHLs 敏感的根癌农杆菌快速检测 AHLs。Martínez 等发现从鱼类和肉制品中分离的 *Yersinia Enterocolitica* 有合成 AHLs 基因,可形成 OHHL 和 C6-HSL^[3]; Bruhn 等提出细菌密度在 10⁶cfu/g 时,在真空包装肉制品中检测到 AHLs^[4]; Hentzer 等认为抑制 AHLs 调控基因表达,可延长肉制品与鱼类产品的保质期^[5]。

生物被膜是细菌为适应生存环境形成的一种与浮游细菌相对应的生长方式。在食品生产加工过程中,细菌生物被膜会污染食品。食源性病原菌和腐败菌形成的生物被膜以残留、接触的方式引起污染,通过散播微生物或微生物团的途径污染生产环境^[6]。李燕杰等提出据专家估计几乎所有的细菌在一定条件下都可形成生物被膜^[7]。刘琳等的研究表明,在天然或培养条件下,AHLs 是细菌生物被膜内细胞间的信息传递分子,在形成和维持被膜的三维结构上起关键作用^[8]。Davies 等发现,细菌 QS 及特异基因参与生物被膜的形成过程^[9]。Kjelleberg 等表明 AHLs 调控细菌粘附、游动、生物被膜丛形成^[10]。

本文选取产生物胺优势菌克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌、成团泛菌作为研究对象, QS 生物检测法分析 3 株优势菌 QS 现象;探讨细菌群体感应 AHLs 对菌株生物胺累积的影响及菌株生物被膜特性分析,为研究新疆熏马肠中生物胺的产生机理奠定理论基础,为熏马肠工业化生产提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株与培养条件

供试菌株:微生物传感菌 *Agrobacterium tumefaciens* KYC55、*Agrobacterium tumefaciens* A136、*Agrobacterium tumefaciens* R10 均在 28℃、LB 液体培养基活化,根癌农杆菌 KYC55 需添加壮观霉素 50

μg/mL、四环素 4.5 μg/mL、庆大霉素 15 μg/mL;根癌农杆菌 A136 添加壮观霉素 50 μg/mL、四环素 4.5 μg/mL;根癌农杆菌 R10 添加四环素 4.5 μg/mL。群体感应菌株均由中国海洋大学食品学院水产品高值化利用实验室惠赠。

试验菌株:熏马肠产生物胺优势菌克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌、成团泛菌。

1.2 试剂和设备

主要试剂:壮观霉素、四环素、卡那霉素、X-gal、ONPG 和 β-巯基乙醇、色胺、腐胺、苯乙胺、组胺、酪胺、尸胺、精胺、亚精胺及丹磺酰氯,均购自 Sigma 公司(美国);其它常规试剂。均购自西安塞维斯生物技术有限公司。

主要仪器设备:SW-CJ-ZD 双人单面洁净工作台,苏州苏洁净化设备有限公司;XH-C 漩涡混合器,金坛市医疗仪器厂;Heal Force 台式高速离心机,Neofuge 公司;DNP-9272 型电热恒温培养箱,上海精密实验设备有限公司;LC-2010AHT 高效液相;UV-紫外分光光度计,美国 GE Amersham Biosciences 公司;BioTeK 酶标仪,上海坤肯有限公司;XDB-C18(5 μm, 4.6 mm×250 mm)的色谱柱等。

主要培养基:LB 培养基、营养肉汤液体培养基(NB 培养基)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB 培养基)。

数据分析软件:Excel 数据处理软件、SPSS17.0 统计软件、Origin8.0 绘图软件。

1.3 试验方法

1.3.1 AHLs 检测

参考文献^[11]并稍作改进,将 AHLs 微生物传感菌根癌农杆菌 A136、根癌农杆菌 R10 与待测菌株采用 LB 液体培养基活化,传感菌添加相应的抗生素,在 LB 平板上待检测菌与微生物传感菌平行划条,28℃ 过夜培养,根癌农杆菌 R10 作对照菌。根癌农杆菌 A136 作信号分子检测菌,需在 LB 平板上涂布 20 μL 显色试剂 X-gal。

1.3.2 AHL 活性分析-β-半乳糖苷酶法

本法参照文献^[12]并稍作改进,将试验主要分为三部分。第一部分:测定产生物胺菌株的生长曲线。具体方法如下:活化产生物胺菌,按 1% 体积比接种至 LB 液体培养基中,28℃ 恒温培养。每 4 h 取样,测其 OD₆₀₀。第二部分:制备上清液。将待测菌株接种至 LB 液体培养基中,4 h 取一次产生物胺菌株菌悬液,离心菌液(12000 r/min、10 min),并将上清液保存在 -20℃。同时培养阳性对照菌株 R10(pcF218)至 OD₆₀₀

在 1.5~2.0 左右,离心及保存上清液于-20℃。第三部分:生物显影。具体方法如下:按 1% 体积比接种检测菌株 KYC55 至 LB 培养基中,在对应的三角瓶中分别加入 10% 体积的产生物胺菌株的上清液,28℃ 摇动培养至 OD₆₀₀0.6 左右。将培养完成的菌液移取 200 μL 置于 2.0 mL 离心管中,并加入 800 μL Z-buffer、100 μL SDS 和 150 μL 三氯甲烷,充分振荡。加入显色底物邻硝基苯-β-D-吡喃半乳糖苷(ONPG)100 μL,充分振荡,并记录下开始时间。待溶液变黄后加入 0.6 mL 1 M Na₂CO₃ 终止反应,记录终止时间。将反应液离心测 OD₄₂₀,以剩余菌液测 OD₆₀₀。按以下公式计算 β-半乳糖苷酶的活性,其中 T 为反应时间,单位为 min;V_{菌液} 为步骤 2 中添加菌液的体积,单位为 mL。

$$\text{Miller Units} = \frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{\text{OD}_{600} \times T \times V_{\text{菌液}}}$$

1.3.3 生物胺检测方法

表 1 生物胺测定梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program of biogenic amines

洗脱时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.1	35.0	65.0
5.0	25.0	75.0
20.0	0.0	100.0
24.0	0.0	100.0
25.0	35.0	65.0
30.0	35.0	65.0

生物胺检测法依据文献^[3]并稍作改进,具体如下:第一部分:产生物胺菌株培养。将 3 株产生物胺菌按 1% 接种量接入 NB 液体培养基中活化后,再接入到加 0.005% 的磷酸吡哆醛和 0.05% 氨基酸前体(酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸)的 NB 液体培养基中 28℃、每隔 4 h,12000 r/min、10 min 离心取 1 mL 上清液加入 0.4 mol/L 高氯酸 1 mL,-20℃ 避光保存、待测。第二部分:柱前衍生。取上述处理液 1 mL,加入 200 μL 2 mol/L NaOH 使溶液呈碱性,再加入 300 μL 饱和 NaHCO₃ 溶液进行缓冲,继续加入 2 mL 10 mg/mL 的丹磺酰氯(Dns-Cl)丙酮溶液,在黑暗条件 40℃ 反应,45 min 后加入 100 μL 的 NH₃·H₂O 终止反应,去除残留的 Dns-Cl 溶液。用乙腈定容到 5 mL,用 0.22 μm 滤膜过滤后避光保存待测。第三部分:绘制生物胺标准曲线。准确称取色胺、酪胺、腐胺、苯乙胺、尸胺、组胺、精胺、亚精胺各 50 mg,用 0.4 mol/L 的高氯酸定容到 50 mL,并分别稀释为:5、10、25、50、100、200 μg/mL 终浓度的混合标准溶液。取 1 mL 标准品的混合溶液,柱前衍生(方法同上),利用 HPLC 测定其生物胺,以生物胺含量为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准

曲线。第四部分:色谱条件。XDB C18 柱(5 μm,4.6 mm×250 mm);流动相 A 为超纯水,流动相 B 为乙腈;流速为 0.8 mL/min;进样量:20 μL;柱温:30℃;检测波长:254 nm。

1.3.4 产生物胺菌株生物被膜能力测定

本法参照文献^[4]并加以改进,首先,产生物胺菌选用 TSB 培养基 37℃、24 h 活化。37℃ 培养菌株,12000 r/min、10 min 离心去除上清液。同时,细胞沉降物用 10 mL 的 PBS(pH=7.2)清洗 3 次,将清洗后的细胞降解物再用 PBS 重悬,最终保持细胞的菌落总数在 10⁸ cfu/mL。

其次,将上述步骤中细胞沉降物 PBS 稀释细胞密度在 10⁷ cfu/mL,20 μL 菌悬液移至盛装 180 μL TSB 培养基的 96 孔板中,28℃、37℃ 培养可促进生物被膜的形成,设置空白对照,观察培养 1 d、3 d、5 d。将培养完成后的菌株用去离子水冲洗培养完成的菌悬液 3 次,自然干燥 45 min。孔板注入 200 μL 0.25% 的结晶紫染色 30 min,移除溶解液,无菌去离子水冲洗 3 次,再用 95% 乙醇溶解 30 min,570 nm 测 OD 值。

1.3.5 细胞疏水性检测

参考文献^[5]并加以改进,具体方法如下。将待测菌 TSB 培养完成后,12000 r/min、10 min 离心去除上清液。细胞沉降物用 10 mL 的 PBS(pH=7.2)清洗 3 次,将清洗后的细胞降解物再用 PBS 重悬,最终保持细胞的菌落总数在 10⁸ cfu/mL。将细胞沉降物密度稀释到特定的密度范围并测得 OD₆₀₀ 在 0.8 左右。在 2 mL 的细胞悬浮液中添加 0.5 mL 二甲苯、0.5 mL 三氯甲烷、0.5 mL 乙酸乙酯,混匀涡流悬浮 2 min。将上述步骤制备的悬浮液体在室温条件下静置 15 min,观察水相和有机相分离程度。移取水相并测定 OD₆₀₀。分析判断细胞疏水程度。

$$\text{疏水值} = \left(\frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) \times 100$$

注:A₀:细胞菌悬液 OD₆₀₀A₁:水相 OD₆₀₀,若疏水值大于 50% 则为高疏水性,疏水值介于 20%~50% 为中疏水性,疏水值小于 20%,为疏水性。

1.3.6 数据统计分析

试验数据通过 Excel 数据处理,采用 Origin 8.0 绘图,通过 SPSS 17.0 统计软件进行相关性分析及显著性分析。

2 结果分析

2.1 AHLs 检测

Vattem DA 等提出 QS 生物检测法是将转录调节基

因通过一种稳定表现型结合到报告基因。在此模式下, *Agrobacterium tumefaciens* acyl-HSL 生物检测法能够将 *traR* (*luxR* 同源染色体) 基因结合到 *lacZ*, 通常选用显色试剂 X-gal 可检测 β -半乳糖苷酶活性来检测到菌株中 AHLs^[16]。根癌农杆菌 A136、KYC55 作为 QS 报告菌是基于细菌群体感应作用机制, A136、KYC55 中产生 AHLs 的功能基因被人工剔除或其本身就不能产生 AHLs, 但含有合成信号分子的功能基因和其相应的靶启动子序列以及与其融合在一起的报告基因^[17]。研究选取根癌农杆菌 A136 为 AHLs 的生物感应器, 当遇到外源 AHLs 时, 报告基因的转录和表达被启动。据图 1 可知, 新疆熏马肠中产生物胺菌能够分泌群体感应信号分子 AHLs, 通过琼脂层的扩散至群体感应报告菌株 A136, 使报告菌株发生蓝色变化。即 3 株产生物胺优势菌能够发生 QS 现象。



图 1 产生物胺菌群体感应现象 AHLs 检测图谱

Fig.1 Detection QS of AHLs in three biogenic amine-producing strains

2.2 自体诱导物活性检测

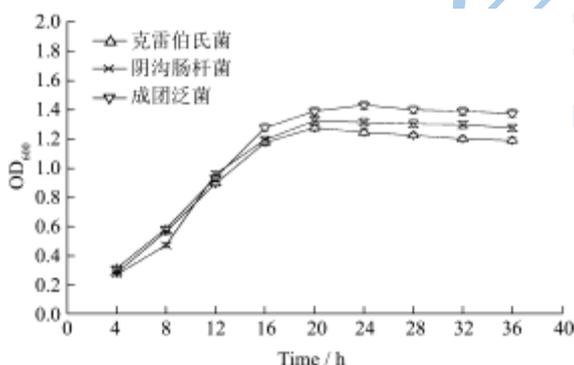


图 2 3 株的生长曲线图

Fig.2 Growth curve of three biogenic amine-producing strains

根据 β -半乳糖苷酶活性检测 QS 水平的基本原理, 待测菌分泌的 AHL 可诱导 KYC55 或 A136 大量表达 β -半乳糖苷酶。AHLs 的活性可通过 β -半乳糖苷酶的活性强弱来反映, 外源信号分子 AHLs 可诱导 KYC55 中基因大量表达 β -半乳糖苷酶, 且该酶能够使底物邻硝基苯- β -D-吡喃半乳糖苷 (ONPG) 水解产生黄色的邻硝基苯酚 (ONP), 外源的 AHLs 含量越高, 微生物传感菌 KYC55 产生的 β -半乳糖苷酶的活性也就越强。因此, 可通过吸光度法检测 β -半乳糖苷酶活性, 间接地反映

待测菌产生 AHLs 情况。Torres 等报道革兰氏阴性菌细菌种内的自体诱导物是 AHLs, 在细菌培养基环境中, AHLs 随细菌种群的密度的增加而积累, 达到一定的浓度阈值时, 结合到 AHLs 受体蛋白 (*luxR* 转录调节基因), 激活目的基因的表达, 进而调控相应的性状表达^[18]。

据图 2 可知, 3 株产生物胺菌在 4~8 h 信号分子的分泌较少即 β -半乳糖苷酶活性低于 300 Miller Units, 可能是由于接种到新鲜培养基液的细胞一时还缺乏分解或催化形成 AHLs 的酶 (*luxI* 蛋白酶)。在生长进入对数期 8~20 h 可知 β -半乳糖苷酶活性呈现明显的上升趋势, 其中成团泛菌活性达到 582.4746 Miller Units。据群体感应概念可知, 随细菌种群密度达到一定数量时, 信号分子的分泌会达到一定的浓度阈值。3 株菌在生长 20 h 后均进入生长稳定期, 在产胺菌生长进入稳定期后信号分子分泌也随之增多, 在 24 h 后 β -半乳糖苷酶活性变化不大, 说明产生物胺菌株分泌的信号分子达到一定的浓度阈值。因此, 发生群体感应的产生物胺菌在不同的生长时期, 信号分子的分泌量不同。

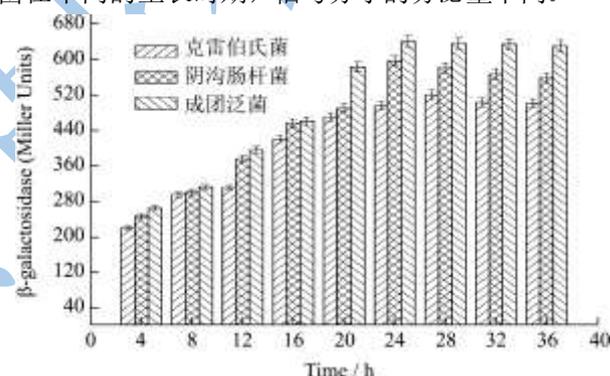


图 3 3 株生物菌 β -半乳糖苷酶活性检测图谱

Fig.3 Histogram of β -galactosidase activity of biogenic amine-producing strains

2.3 AHLs 分泌对生物胺累积影响分析

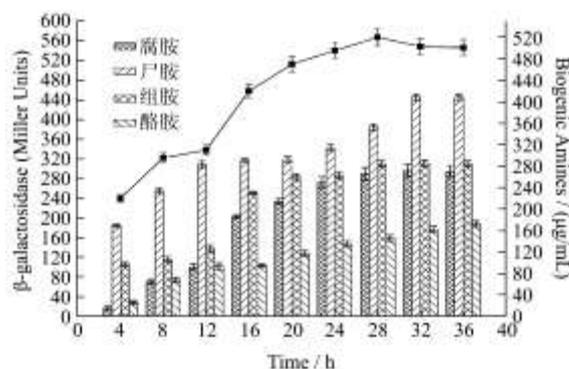


图 4 克雷伯氏菌 AHLs 分泌对产生物胺量的影响分析

Fig.4 Analysis of the effect of AHL secretion on biogenic amine production in *Klebsiella* spp

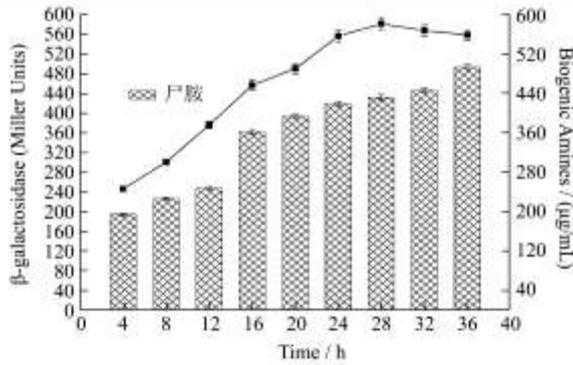


图5 阴沟肠杆菌 AHLs 分泌对产生物胺量的影响分析

Fig.5 Analysis of the effect of AHL secretion on biogenic amine production in *Enterobacter cloacae*

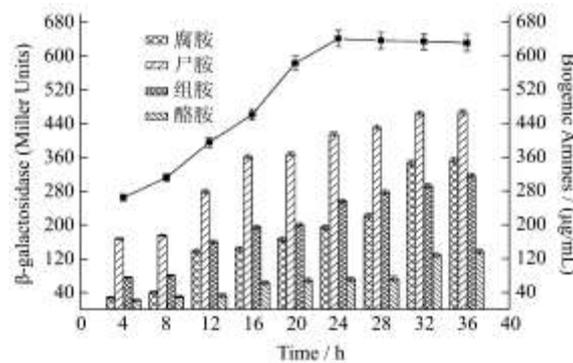


图6 成团泛菌 AHLs 分泌对产生物胺量影响分析

Fig.6 Analysis of the effect of AHL secretion on biogenic amine production in *Pantoea agglomerans*

AHLs 产生与环境因素相关,如环境温度和碳源种类对信号分子的产生水平有动态的影响;QS 与细菌生长、营养饥饿相关,饥饿和细胞密度决定细菌生长是否进入稳定生长期。不少研究者采用最低营养物质水平的基质来促使群体感应信号分子的产生。生物胺产生必须具备三个条件:①可利用的自由氨基酸;②氨基酸脱羧酶阳性微生物;③适宜的环境条件,以利于细菌的生长、脱羧酶的合成和稳定的脱羧酶活性^[19]。

依据生物胺的产生条件及群体感应信号分子自体诱导物活性,研究在培养基体系下,信号分子的分泌对菌株生物胺量的影响分析。

如图4、5、6所示,AHLs 分泌在产生物胺菌株对数生长后期和稳定生长期较其它生长时期多,菌株生物胺的累积也随其变化。图4 所呈现克雷伯氏菌中尸胺、腐胺、组胺、酪胺随 β-半乳糖苷酶活性变化趋势都较为明显,其中尸胺产生量最多。在培养至 36 h 即信号分子分泌值为 500.59 Miller Units 时,尸胺含量达到 440.39 μg/mL。图5 所示阴沟肠杆菌在生长对数期至稳定期时,AHLs 的分泌量逐渐增多,尸胺也随之积累,且趋势明显。在阴沟肠杆菌生长稳定期后期,β-半乳糖苷酶的活力有所降低,而尸胺的积累增量变化

不大。据图6 可知,产生物胺优势菌成团泛菌的 β-半乳糖苷酶的活性较其它2 株产生物胺菌株高,即 AHLs 的分泌量多,在达到稳定期时可达 620 Miller Units,尸胺、腐胺、组胺、酪胺积累量随 AHLs 的分泌量的增多而增多。研究初步可表明,产生物胺菌株群体感应信号分子的分泌将影响生物胺量的积累,具有协同作用。

2.4 信号分子的分泌与生物胺相关性分析

QS 系统感知种内细菌数量的特异性主要由两方面决定:一是 *luxI* 蛋白酶催化底物具有专一性,识别含有特殊酰基化侧链的 AHLs;二是受体 *luxR* 与 AHLs 信号分子的结合具有特异性。AHLs 具有专一性、特异性,特异性起源于 *luxI* 蛋白对相应的 HSL 配体的高度选择性^[20]。温度影响生物胺的形成,在温度小于 5 °C 或大于 40 °C 不利于生物胺的产生,非最适温度范围条件下,微生物生长一定程度上受到抑制,有关酶的活性降低,使生物胺的积累下降,在 20 °C~37 °C 温度条件是有利于生物胺的积累。

表2 产生物胺菌 β-半乳糖苷酶与生物胺相关性

Table 2 Pearson correlations between β-galactosidase in biogenic amine-producing stains and biogenic amines

相关性分析	酶	生物胺			
		腐胺	腐胺	腐胺	腐胺
克伯雷氏菌	β-半乳糖苷酶	0.995**	0.872**	0.985**	0.933**
阴沟肠杆菌	β-半乳糖苷酶	0.000	0.002	0.000	0.000
成团泛菌	β-半乳糖苷酶	0.859*	0.938**	0.954*	0.817*

: **相关性在 0.01 (双侧) 水平上显著; *相关性在 0.05 (双侧) 水平上显著。

依据生物胺产生条件和 AHLs 特异性选定 28 °C 这一温度条件监测产生物胺菌株信号分子的分泌对产生物胺量影响,探讨产生物胺菌发生群体感应现象时分泌的信号分子与生物胺的积累间的相关性。AHLs 的活性可通过 β-半乳糖苷酶的活性强弱来反映,因此对 3 株产生物胺菌进行 β-半乳糖苷酶活性与生物胺的 Pearson 相关系数相关性分析。如表2 结果所示,克雷伯氏菌、成团泛菌的 β-半乳糖苷酶活力与腐胺、尸胺、组胺、酪胺均显著相关 ($p < 0.01$),阴沟肠杆菌的尸胺与 β-半乳糖苷酶活力的相关性极显著 ($p = 0.00 < 0.01$)。由此可知,在产生物胺菌不同的生长时期,群体感应信号分子的分泌与菌株生物胺积累具有相关性,即产生物胺菌群体感应信号分子的分泌影响生物胺的积

累，具有协同作用。

2.5 产生物胺菌株生物被膜分析

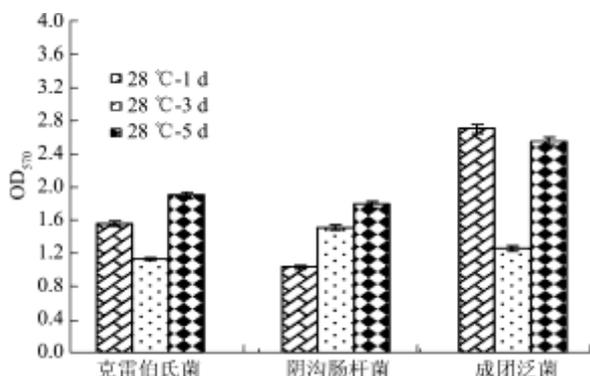


图 7 28 °C 3 株产胺菌生物被膜能力分析

Fig.7 Biofilm formation of three biogenic amine-producing strains incubated in TSB at 28 °C

Note: Each bar represents mean and standard deviations of measurements.

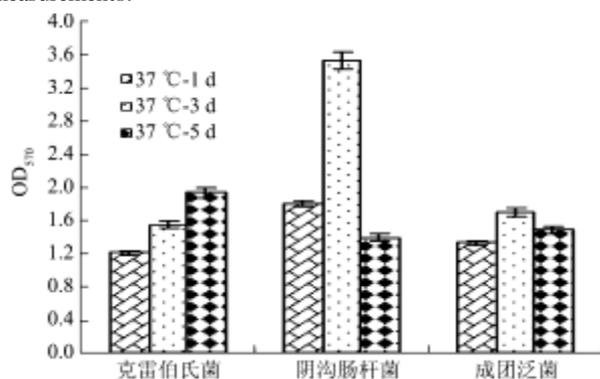


图 8 37 °C 3 株产胺菌生物被膜能力分析

Fig.8 Biofilm formation of three biogenic amine-producing strains incubated in TSB at 37 °C

Note: Each bar represents mean and standard deviations of measurements.

在发酵肉制品（如传统香肠）中，一些肉制品内生菌（*Staphylococci*, *Lactobacilli*）能够形成生物被膜，促进食品发酵。在发酵肉制品加工过程的环境中，不同种属细菌聚集能够抑制生物被膜的形成。不同属的细菌形成的生物被膜稳定性较同一种属强^[21]。而 AHLs 可吸引同属细菌聚集，达到一定种群密度时，AHLs 浓度升高，达到一定浓度阈值时激活细菌体的特定基因，特定基因被活化进而使得细菌分泌出构成胞外基质的糖蛋白复合物，从而形成完整的细菌生物被膜结构。Kjelleberg 等认为由 AHLs 介导的细菌 QS 系统在细菌生物被膜形成、附着、固定过程起着关键性作用^[10]。Kadam 认为温度和营养物质是影响细菌生物被膜形成的重要因素^[20]。因此，研究在 TSB 培养基体系中不同温度条件下 3 株产胺菌的生物被膜的形成能力。由图 7、

图 8 分析可知 3 株产生物胺菌在 28 °C、37 °C 条件下均能够形成生物被膜，营养物质和培养时间影响生物被膜的形成，培养时间越长，菌株营养物质被消耗的越多，细菌分泌的代谢产物也越多；但是不同菌株受影响程度也不同。且在两温度条件下，克雷伯氏菌形成生物被膜的能力差异不显著（ $P=0.095>0.05$ ），阴沟肠杆菌形成生物被膜的能力差异显著（ $P=0.0315<0.05$ ），成团泛菌形成生物被膜的能力差异显著（ $P=0.047<0.05$ ）。

2.6 细胞疏水性

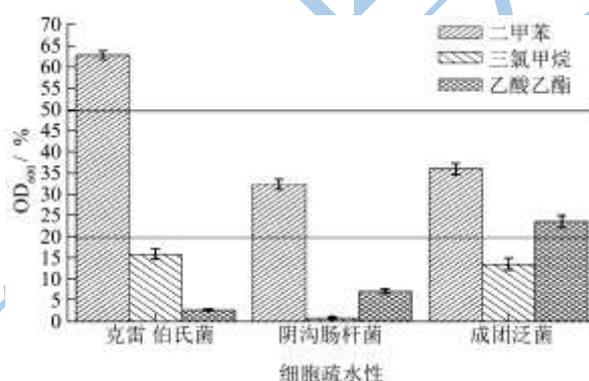


图 9 3 株产生物胺菌细胞疏水性图谱

Fig.9 Cell hydrophobicity of three biogenic amine-producing strains

Note: Each bar represents mean and standard deviations of the mean of all the measurements.

细菌细胞疏水性是决定细菌非特异性黏附到各种生物和非生物表面及界面的最重要的因素之一，也是影响细菌吸收和降解疏水性有机物质的主要因素之一。细菌在宿主表面粘附是细菌生物被膜形成的第一阶段。Y. Beyatli 等报道细菌细胞附着于生物体界面是个复杂的过程，包括细胞与界面的结合度和细胞内和细胞间结合程度。并提出细菌细胞的聚集特性与细胞的依附性质^[15]。细胞疏水性能可通过对有机溶剂的吸附能力来体现。依据上述观点，分析 3 株产生物胺菌细胞的疏水性。由图 9 分析可知 3 株产生物胺菌株对有机溶剂二甲苯、三氯甲烷、乙酸乙酯的吸附能力均不同，对有机溶剂二甲苯吸附能力分析发现，克雷伯氏菌对二甲苯有较好的吸附能力，细胞疏水值大于 50%，其它 2 株产生物胺菌细胞疏水值均在 20%~50% 之间；对有机溶剂三氯甲烷吸附能力分析，阴沟肠杆菌和成团泛菌的细胞疏水性值均在 20%~50% 之间，而克雷伯氏菌细胞疏水值小于 20%；对有机溶剂乙酸乙酯吸附能力分析，只有成团泛菌细胞疏水值在 20%~50% 范围内，其它两株产生物菌株细胞疏水值均低于 20%。因此，可得出 3 株产生物胺菌株对同一种

有机溶剂的吸附能力不同, 细胞疏水性能不同; 产生物胺菌株对不同类型的有机溶剂的吸附能力也不同, 细胞疏水性能均不同; 而产生物胺菌株细胞的疏水性影响其生物被膜的形成能力。

3 讨论

Apostolos 等在 2006 年报道在未来食品研究过程中, 生物胺作为肉制品在贮藏过程中的质量与安全标尺^[22]。高宗良等指出有研究表明群体感应参与食品变质的全过程, 与食品腐败相关的蛋白质、脂肪、果胶、壳多糖等分解酶活性均受 QS 的调控^[23]。而生物胺的形成依赖于微生物产生的氨基酸酶催化氨基酸脱羧和生物胺氧化酶催化生物胺氧化。通过 AHLs 分泌影响产生物胺量分析及 β -半乳糖苷酶与生物胺相关性分析, 由此可知 3 株产生物胺菌的 β -半乳糖苷酶活性与产胺菌生物胺均显著相关。研究表明, 群体感应影响产生物胺菌株生物胺的形成, 具有协同作用。

研究发现, QS 贯穿于被膜形成的所有阶段, 通过调节种群密度和成熟被膜内的代谢活动来适应营养需求。最早, Davies 在 Science 发表铜绿假单胞菌 *las* 系统在细菌生物被膜形成中的作用提出, AHLs 调控细菌的粘附、游动、细菌生物被膜丛的形成。铜绿假单胞菌有两套 AHL- 依赖的 QS 系统: *lasI/lasR* 和 *rhlI/R*, 分别识别 3-oxo-C₁₂-HSL 和 C₄-HSL, *rhl* 系统对细菌生物被膜形成至关重要, *las* 系统决定细菌生物被膜结构的差异性, 在不可逆粘附期起着重要作用^[9]。因此, 分析新疆熏马肠中 3 株产生物胺菌株的生物被膜形成能力及细胞疏水性, 试验结果可知产生物胺菌均能够形成生物被膜而高温则抑制生物被膜的形成, 不同产生物胺菌株细胞对不同的有机溶剂疏水性不同。

4 结论

4.1 克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌、成团泛菌能够发生群体感应现象。产生物胺优势菌在不同的生长时期, AHLs 与生物胺量显著相关 ($P < 0.01$), AHLs 分泌影响菌株生物胺量的产生, AHLs 对菌株生物胺量产生具有协同作用。

4.2 3 株优势菌对二甲苯、三氯甲烷、乙酸乙酯吸附能力不同, 细胞疏水值均不同; 克雷伯氏菌形成生物被膜的能力差异不显著 ($P = 0.095 > 0.05$), 阴沟肠杆菌、成团泛菌形成被膜的能力差异显著 ($P = 0.0315 < 0.05$, $P = 0.047 < 0.05$); 细胞疏水能力、培养时间、温度影响产胺菌生物被膜形成。

参考文献

- [1] 马宇霞, 卢士玲, 李开雄, 等. 熏马肠中产生物胺氧化酶菌株的筛选与鉴定[J]. 现代食品科技, 2014, 05: 49-55
MA Yu-xia, LU Shi-ling, LI Kai-Xiong, et al. The screening and identification of bacterial species amine oxidase productive strains from smoked horse intestine [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 05: 49-55
- [2] 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
- [3] Medina - Martínez M S, Uyttendaele M, Meireman S, et al. Relevance of N - acyl - L - homoserine lactone production by *Yersinia enterocolitica* in fresh foods [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(4): 1150-1158
- [4] Arevalo - Ferro C, Hentzer M, Reil G, et al. Identification of quorum - sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics [J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(12): 1350-1369
- [5] 柯春晖, 上官苗苗. 食源性致病菌生物被膜的危害与防治[J]. 食品工业, 2013, 2: 149-151
KE Chun-Hui, SHANG GUAN Miao-miao. Foodborne pathogenic bacterial biofilm hazard and prevention [J]. Food industry, 2013, 2: 149-151
- [6] Hentzer M, Wu H, Andersen J B, et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors [J]. The EMBO journal, 2003, 22(15): 3803-3815
- [7] 李燕杰, 杜冰, 董吉林, 等. 食品中细菌生物被膜及其形成机制的研究进展[J]. 现代食品科技, 2009, 25(4): 435-438
LI Yan-jie, DU Bing, DONG Ji-lin, et al. Reserch advance of bacterial biofilm and its formation mechanism in food [J]. Modern Food Science and Technology, 2009, 25(4): 435-438
- [8] 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. Linking quorum sensing regulation and biofilm formation by bacterial [J]. Microbiology China, 2012, 52(3): 271-278
- [9] Davies D G, Parsek M R, Pearson J P, et al. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm [J]. Science, 1998, 280(5361): 295-298
- [10] Kjelleberg S, Molin S. Is there a role for quorum sensing signals in bacterial biofilms? [J]. Current opinion in microbiology, 2002, 5(3): 254-258
- [11] Blosser R S, Gray K M. Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers [J].

- Journal of Microbiological Methods, 2000, 40(1): 47-55
- [12] 毕相东. 小球藻与优势共栖异养细菌间的相互作用及其对细菌群体感应信号分子的响应[D]. 中国海洋大学, 2013
BI Xiang-dong. Ecological effects between *Chlorella vulgaris* and dominant associated heterotrophic bacteria and response to quorum sensing signal molecules [D]. Ocean University of China, 2013
- [13] 卢士玲, 李开雄, 徐幸莲, 等. 传统香肠中产生物胺肠细菌和乳酸菌分离方法的研[J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(8): 47-52
LU Shi-ling, LI Kai-xiong, XU Xing-lian et al. Isolation biogenic amines enterobacteria and lactic acid bacteria from in tradition sausage [J]. Food and Fermentation Industries, 2012, 38(8): 47-52
- [14] Hu-Hu Wang, Ye K P, Zhang Q Q, et al. Biofilm formation of meat-borne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Food Control, 2013, 32(2): 650-658
- [15] Darilmaz D O, Beyatli Y, Yuksekdog Z N. Aggregation and hydrophobicity properties of 6 dairy propionibacteria strains isolated from homemade Turkish cheeses [J]. Journal of Food Science, 2012, 77(1): M20-M24
- [16] Chu W, Vatter 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
- [17] De Lamo Marin S, Xu Y, Meijler M, et al. Antibody catalyzed hydrolysis of a quorum sensing signal found in Gram-negative bacteria [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007, 17(6): 1549-1552
- [18] Torres M, Romero M, Prado S, et al. N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from hatchery bivalve larval cultures [J]. Microbiological Research, 2013, 168(9): 547-554
- [19] 肖洪, 丁晓雯, 梁菡峪, 等. 发酵食品中的生物胺及其控制研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 346-350
XIAO Hong, DING Xiao-xia, LIANG Han-gu, et al. Research progress in the biogenic amines and its control measures in fermented food. [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(20): 346-350
- [20] Nilsson R E, Ross T, Bowman J P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 150(1): 14-24
- [21] Giaouris E, Heir E, Hébraud M, et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods [J]. Meat Science, 2013
- [22] Patsias A, Chouliara I, Paleologos E K, et al. Relation of biogenic amines to microbial and sensory changes of precooked chicken meat stored aerobically and under modified atmosphere packaging at 4 °C [J]. European Food Research and Technology, 2006, 223(5): 683-689
- [23] 高宗良, 谷元兴, 赵峰, 等. 细菌群体感应及其在食品变质中的作用[J]. 微生物学通报, 2012, 39(7): 1016-1024
GAO Zong-liang, GU Yuan-xing, ZHAO Feng, et al. Quorum sensing of bacteria and its effect on food spoilage [J]. Microbiology China, 2012, 39(7): 1016-1024