

# 大菱鲆荧光假单胞菌的群体感应现象及不同碳源培养下的腐败特性研究

崔方超<sup>1</sup>, 李婷婷<sup>2</sup>, 刘明爽<sup>1</sup>, 马燕<sup>1</sup>, 励建荣<sup>1</sup>

(1. 渤海大学食品科学研究院, 辽宁省食品安全重点实验室, 辽宁锦州 121013)

(2. 大连民族学院生命科学学院, 辽宁大连 116600)

**摘要:** 本文以大菱鲆分离的荧光假单胞菌作为研究对象, 紫色杆菌 CVO26 平行划线法检测信号分子。不同碳源 (葡萄糖、蔗糖、果糖、木糖、乳糖、麦芽糖) 的 AB 培养基培养并检测其生物被膜、嗜铁素和胞外蛋白酶的生成量, 同时添加外源的信号分子标准品, 研究 AHLs 与腐败因子之间的相关性。研究表明: 大菱鲆分离的荧光假单胞菌能够发生群体感应现象, 经不同碳源培养, 其腐败因子产生情况有明显差异, 碳源的添加对生物被膜的产生有促进作用, 对胞外蛋白酶的生成没有显著影响; 以葡萄糖、麦芽糖为碳源, 生物被膜的产生量较高; 以蔗糖和乳糖为碳源, 嗜铁素的产量较高。添加外源信号分子标准品, 生物被膜、嗜铁素和胞外蛋白酶的生成量有显著提高。因此, 生物被膜、嗜铁素和胞外蛋白酶的生成与 AHLs 有关, 群体感应现象可调控腐败特性的表达, 并在水产品腐败过程中发挥作用。

**关键词:** 荧光假单胞菌; 群体感应信号分子; 生物被膜; 嗜铁素; 胞外蛋白酶

文章编号: 1673-9078(2015)12-49-55

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.12.008

## Quorum-sensing Phenomenon in *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Turbot and Spoilage Characteristics Using Different Carbon Sources

CUI Fang-chao<sup>1</sup>, LI Ting-ting<sup>2</sup>, LIU Ming-shuang<sup>1</sup>, MA Yan<sup>1</sup>, LI Jian-rong<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Food Science of Bohai University, Food Safety Key Lab of Liaoning Province, Jinzhou 121013, China)

(2. College of Life Science, Dalian Nationality of University, Dalian 116600, China)

**Abstract:** *Pseudomonas fluorescens* isolated from turbot was used as a test strain. Quorum-sensing signal molecules were detected by a parallel streak method using *Chromobacterium violaceum* CVO26 strain. The bacteria were cultured in AB medium supplemented with different carbon sources (glucose, sucrose, fructose, xylose, lactose, or maltose), and biofilm formation, and siderophore and extracellular protease production was measured. Simultaneously, N-acylhomoserine lactones (AHLs), a class of external quorum-sensing compound, were added to the culture in order to determine the relationship between AHLs and spoilage factors. Quorum-sensing phenomenon was observed in the tested strain culture, and the production of spoilage factors significantly differed between different carbon sources used. The addition of carbon sources promoted biofilm formation, but it had no significant influence on the production of extracellular protease. The biofilm formation was relatively high when glucose and maltose were used as the carbon source, and a relatively high rate of siderophore production was observed when sucrose and lactose were used. The biofilm formation and siderophore and extracellular protease production were significantly enhanced when the external quorum-sensing signal molecules were added. Therefore, the biofilm formation and siderophore and extracellular protease production are related to AHLs, and quorum-sensing phenomenon might control the effects of spoilage factors, and play a role in the spoilage of aquatic products.

**Key words:** *Pseudomonas fluorescens*; quorum-sensing signal molecules; biofilm; siderophore; extracellular protease

收稿日期: 2015-01-31

基金项目: 国家自然科学基金 (31471639, 31301572); 中国博士后科学基金 (2014M552302); 重庆市项目博士后资助 (Xm2014041); 高等学校博士学科点专项科研基金课题 (优先发展领域 20113326130001); “十二五” 国家支撑计划项目课题 (2012BAD29B06)

作者简介: 崔方超 (1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 水产品贮藏加工与质量安全控制

通讯作者: 励建荣 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 水产品和果蔬贮藏加工、食品安全; 李婷婷 (1978-), 女, 博士, 副教授

群体感应效应 (Quorum sensing) 是指微生物细胞内通过相应的感应系统感应细胞外的小分子自诱导剂 (Autoinducer, AI) 的浓度从而感知菌体自身密度的大小, 当菌体密度达到一定的阈值时启动一系列的目的基因并表达相应特征的方式<sup>[1]</sup>。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。而微生物的作用是导致鱼类腐败的首要原因, 很多研究表明假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.), 如: 恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 等<sup>[2]</sup>是鱼类水产品低温贮藏过程中的主要腐败优势菌之一<sup>[3]</sup>。荧光假单胞菌是大菱鲆的优势腐败菌之一, 腐败菌与食品腐败相关特性 (胞外水解酶、生物膜、黏液的产生等) 的表达可能受 QS 系统的调控<sup>[4-5]</sup>。荧光假单胞菌可能在 AHLs 调控作用下参与大菱鲆的腐败。嗜铁素是荧光假单胞菌能够成为优势腐败菌的重要因子。嗜铁素 (Siderophore) 是微生物在低铁条件下合成的相对分子质量小的、能特异地螯合  $Fe^{3+}$  的一种螯合因子<sup>[6]</sup>, 嗜铁素主要是通过对铁离子的竞争影响其他细菌的生长。荧光假单胞菌产生的嗜铁素络合环境中铁离子, 使其他微生物得不到足够的铁营养, 生长发育受到抑制, 从而使其能够维持自身的菌体密度。Alain Stintzi 等报道了铜绿假单胞菌通过群体感应调控嗜铁素的产生量<sup>[7]</sup>。生物被膜是微生物为适应胁迫环境、形成有利于生存的特殊生长状态, 是由自身分泌胞外粘质物 (如多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等) 包裹的, 具有高度组织化的多细胞群体结构<sup>[8]</sup>。Davies 等发现, 细菌 QS 及特异基因参与生物被膜的形成过程<sup>[9]</sup>。Kjelleberg 等表明 AHLs 调控细菌粘附、游动、生物被膜丛形成<sup>[10]</sup>。

微生物许多特性的表达受生长阶段、营养状态等环境因素的影响。我们以大菱鲆中分离的荧光假单胞菌为研究对象, 研究了不同碳源 (葡萄糖、果糖、木糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖) 对各腐败因子产生量的影响, 同时, 添加信号分子标准品对各种腐败因子的产生量进行了研究, 以期建立 AHLs 与腐败因子之间的相关性, 为进一步明确群体感应在水产品腐败中的作用, 以及基于干扰腐败细菌群体感应为靶点的水产品保鲜策略提供研究基础。

## 1 材料

### 1.1 供试菌株与培养条件

紫色杆菌 CVO26 *Chromobacterium violaceum* CVO26, 不产 AHLs, *cviI::mini-Tn5* 突变体, C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>-HSL 细菌生物感应器, 卡那霉素抗性<sup>[11]</sup>, 荧光假单胞菌 P001 *Pseudomonas fluorescens* P001, 从市售大菱鲆中分离, 本实验室保存。菌株均在 28 °C、LB 液体培养基活化, 摇床培养, CVO26 需添加卡那霉素 20 μg/mL。

### 1.2 试剂和设备

主要试剂: 信号分子标准品 C<sub>4</sub>-HSL, 购于 Sigma 公司; 卡那霉素、铬天青 S (CAS)、十六烷基三甲基溴化铵 (HDTMA)、PIPES, 购自国药集团化学试剂有限公司; 脱脂奶粉, 购自生工生物工程 (上海) 有限公司, 其它常规试剂均为分析纯。

主要仪器设备: HZQ-X300C 型恒温振荡器, 上海一恒科技有限公司; MS105UD 电子分析天平, 瑞士梅特勒-托利多有限公司; Purifier Logic 生物安全柜, 美国 LABCONCO 公司; BPS-100CA 恒温恒湿培养箱, 上海一恒科技有限公司; MLS-3020 高压蒸汽灭菌, 日本三洋公司; imark 酶标仪, 美国 BIO-RAD; Biofuge Stratos 冷冻高速离心机, 美国 THERMO 公司; UV-2700 紫外可见分光光度计, 日本岛津公司。

主要培养基: LB 培养基、营养琼脂、AB 培养基。

数据分析软件: Excel 数据处理软件、SPSS19.0 统计软件、Origin8.0 绘图软件。

## 2 方法

### 2.1 AHLs 检测

参考文献<sup>[12]</sup>并稍作改进, 将 AHLs 微生物传感菌紫色杆菌 CVO26 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 °C 过夜培养。

### 2.2 AB 培养基

参考文献<sup>[13]</sup>, 制作不同碳源的 AB 培养基: 3 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 0.3 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.15 g/L KCl, 0.01 g/L CaCl<sub>2</sub>·0.0025 g/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 酪蛋白水解氨基酸 5 g/L, 不同碳源的添加量为 5 g/L, 碳源分别为葡萄糖、果糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖。

### 2.3 生长曲线及 pH 测定

将待测菌株过夜活化后, 分别转接于新鲜的 LB 培养液中, 摇培过夜。用新鲜的 LB 将各菌株稀释至

OD<sub>600</sub>=0.5, 以 1:100 (V:V) 的比例将各个相同浓度的菌株接种于新鲜的 LB 培养液和 AB 培养基中, LB 培养液作为对照培养基, 30 °C 条件下 180 r/min 培养, 每隔 4 h 取样, 测定各菌株在 600 nm 的吸光值, 同时测培养液中的 pH。

## 2.4 生物被膜能力测定

参考文献<sup>[14]</sup>将过夜活化的菌悬液与培养基按 1:100 体积混匀后, 加入到无菌的标准 96 孔板中, 每组 4 平行, 以无菌的培养基为空白对照, 在 28 °C 下静置培养。每次取出测定时, 先弃去培养液, 用无菌蒸馏水 250 μL/孔清洗 3 次, 60 °C 或无菌风干燥固定 30 min, 随后用 0.1% 结晶紫溶液 200 μL/孔染色 30 min 后弃去染液, 用无菌蒸馏水 250 μL/孔清洗 3 次, 60 °C 干燥后, 于 200 μL/孔的 95% 乙醇溶解 5 min, 酶标仪法测定 OD<sub>590</sub> 值。不同碳源用 AB 培养基培养, LB 培养作为阴性对照, 另做添加 10 μL 100 μg/mL 的 C<sub>4</sub>-HSL 信号分子标准品的阳性对照, 每个处理 4 个重复。

## 2.5 嗜铁素检测

### 2.5.1 CASAD 嗜铁素平板法检测嗜铁素

利用 CASAD 嗜铁素平板法可检测总的嗜铁素, 不受嗜铁素形态的限制, 根据文献<sup>[15]</sup>, 制作 CASAD 嗜铁素检测平板, 制作过程如下:

(1) 溶液 A: 将 0.06 g 的 CAS (Chrome azurol Sulphonate) 溶于 50 mL 去离子水中, 再加入 10 mL 1 mmol/L 的 FeCl<sub>3</sub> 溶液 (含有 10 mmol/L 的 HCl);

(2) 溶液 B: 将 0.07 g 的 HDTMA (Hexadecyl trimethylammonium bromide) 溶于 40 mL 去离子水中;

(3) 溶液 C: 将 A 溶液沿着烧杯的壁缓缓加入到 B 溶液中, 轻轻晃动, 使得溶液 A 与溶液 B 混合均匀, 即得到溶液 C: CAS 蓝色检测液。121 °C, 15 min 灭菌。

先配制好 1 mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液、1 mmol/L 的 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 溶液、10% 的酸水解酪蛋白溶液 (121 °C, 15 min 单独灭菌); 再分别取 0.2 mL 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液、0.2 mL 的 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 溶液、6 mL 的 10% 的酸水解酪蛋白溶液, 加入生物缓冲液 Pipes (sigma), 调 pH 6.8~7.0。去离子水定容到 100 mL。加入 2 g 琼脂粉, 121 °C, 15 min 灭菌。当以上的固体培养基灭菌后, 温度降低到 60 °C 时, 以 5 mL CAS 蓝色检测液每 100 mL CAS 培养基的量沿着三角瓶壁加入, 混合均匀。注意不要产生气泡, 影响平板检测实验。然后按照每皿 15 mL 倾注于培养皿 (直径 90 mm) 中。

### 2.5.2 嗜铁素相对含量的测定

CAS 蓝色液体检测液的配制方法参考文献<sup>[16]</sup>。荧光假单胞菌菌悬液 10000 r/min, 离心 15 min, 取 3 mL 上清液与等体积的 CAS 蓝色液体检测液混合均匀, 暗处放置 1 h, 检测 630 nm 处的吸光值记为 A<sup>[17]</sup>。取 3 mL 空白培养基与等体积 CAS 蓝色液体检测液混合均匀, 相同条件下测 630 nm 处的吸光值记为 A<sub>r</sub>, 嗜铁素的相对含量 (%) = (A<sub>r</sub> - A) / A<sub>r</sub> × 100。

不同碳源用 AB 培养基培养, LB 培养作为阴性对照, 另做添加 10 μL 100 μg/mL 的 C<sub>4</sub>-HSL 信号分子标准品的阳性对照。每个处理 3 个重复。

## 2.6 蛋白酶活性检测

牛奶平板<sup>[18]</sup>: 在普通肉汤蛋白胨固体培养基中添加终质量浓度为 1.5% 的牛奶。15% 的脱脂乳粉用水溶解后应单独灭菌 (115 °C, 0.06 MPa, 30 min), 铺平板前再与营养琼脂混合。10 mL 15% 脱脂乳粉 (单独灭菌), 加到 90 mL 的营养琼脂中, 混匀, 倒入底层铺有琼脂的平板中, 用牛津杯打孔, 打菌液上清 150 μL, 菌液在不同的培养基中于 30 °C, 180 r/min 下培养, 然后取菌液 10000 r/min 离心 15 min, 菌液打孔之前要过 0.22 μm 无菌滤膜, 不同碳源用 AB 培养基培养, LB 培养作为阴性对照, 另做添加 10 μL 100 μg/mL 的 C<sub>4</sub>-HSL 信号分子标准品的阳性对照, 每个处理设 3 个重复。

## 2.7 数据分析

统计学分析全部数据采用 SPSS 19.0 和 Excel 统计软件处理, 采用 Origin 8.0 绘图。

## 3 结果与讨论

### 3.1 群体感应现象检测

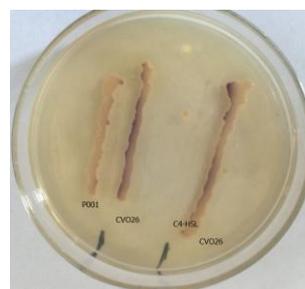


图 1 荧光假单胞菌群体感应现象 AHLs 检测

Fig.1 Detection of QS AHL signals in *Pseudomonas fluorescens*

生物传感菌紫色杆菌 CVO26 本身不产 AHLs, 是 cvil: mini-Tn5 突变体, 当遇到外源 AHLs 时, AHLs 分子会和含有相应的靶启动子序列融合在一起, 促使

报告基因的转录和表达,使得紫色杆菌分泌紫色素<sup>[19]</sup>,通过紫色反应来确定荧光假单胞菌能够发生QS现象,并且用AHLs标准品作为对照实验结果见图1,待测菌株P001能够发生QS现象。

### 3.2 生长曲线测定和pH值变化

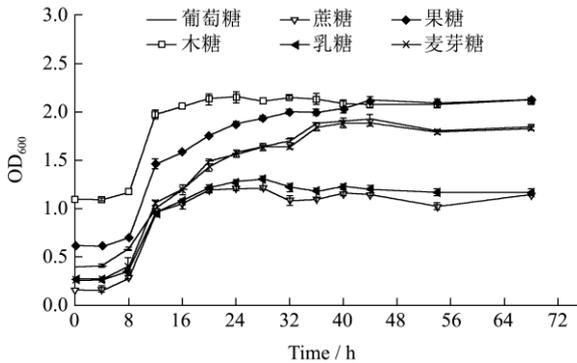


图2 不同碳源培养下菌株的生长曲线

Fig.2 Growth curves of strains in different carbon source cultures

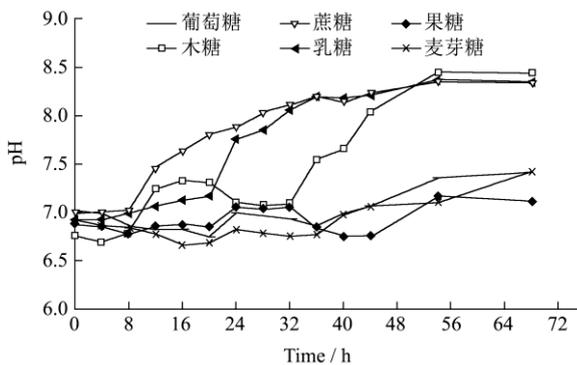


图3 不同碳源培养条件下培养环境的pH值变化

Fig.3 Changes in pH values in the culture with different carbon source cultures

荧光假单胞菌 P001 的生长曲线见图 2。由图 2 可知,最初的 OD 值不同表明了不同碳源的培养基本身颜色的差异,以木糖为碳源的 AB 培养基颜色最深,0~8 h 为细菌生长的延滞期,以乳糖和蔗糖为碳源时,细菌在 8~20 h 为生长的对数期,20 h 之后进入稳定期以及衰亡期,此时最大菌体密度  $OD_{600} \approx 1$ 。而以果糖、葡萄糖和麦芽糖为碳源时,细菌在 8~32 h 为对数期,32 h 后进入稳定期和衰亡期,其最大菌体密度  $OD_{600} \approx 1.5$ 。上述结果表明碳源对菌体生长具有显著影响。而在对数期菌体的密度持续增长,群体感应信号分子的量是与种群密度具有相关性的,Torres 等报道,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<sup>[20]</sup>。

荧光假单胞菌 P001 在不同碳源的 AB 培养基培

养过程中 pH 值的变化情况见图 3。由图可知,不同碳源的培养基的初始 pH 都在 7 附近,以乳糖、木糖和蔗糖为碳源时,培养基的 pH 值自培养开始呈上升趋势,48 h 升至最高为 8.43,之后基本维持不变。而以葡萄糖、麦芽糖和果糖为碳源培养时,培养基的 pH 基本维持在 7 附近。pH 值对 AHLs 的稳定性有明显的影响,随着 pH 的升高,其稳定性下降。AHLs 分子是由一个酰基侧链与一个高丝氨酸内酯环相连,该结构在酸性条件下稳定,强碱会导致高丝氨酸内酯环开环,从而破坏其结构,失去信号分子的作用<sup>[21]</sup>。

### 3.3 生物被膜分析

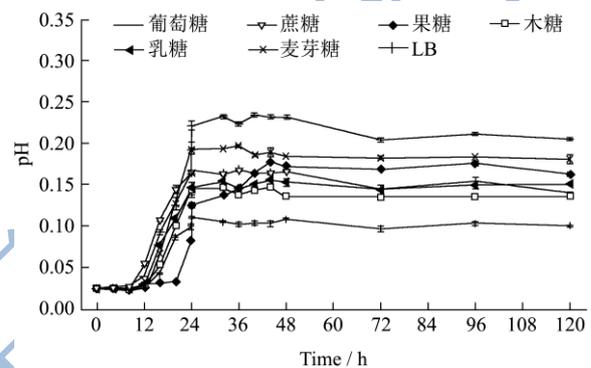


图4 不同碳源培养下荧光假单胞菌生物被膜产生量的生长曲线

Fig.4 P001 biofilm formation growth curve in different carbon source cultures

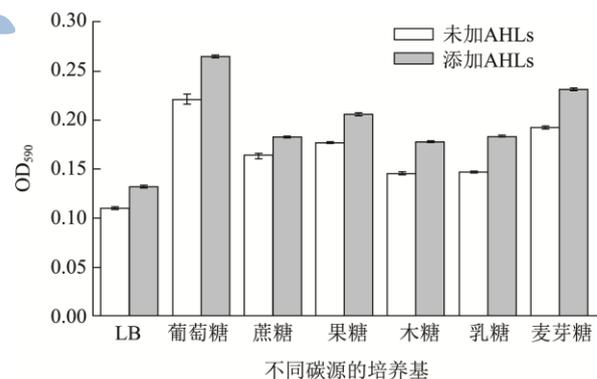


图5 群体感应信号分子对荧光假单胞菌生物被膜产生影响

Fig.5 Influence of quorum-sensing signal molecules on the P001 biofilm formation

不同碳源培养下,荧光假单胞菌 P001 生物被膜形成能力随时间变化情况见图 4。由图可知,0~12 h 生物被膜产生量非常少,细菌以浮游态存在于培养基中,12~24 h 是形成期,24 h 后进入稳定期,96 h 后开始衰老,但生物被膜衰老的比较慢,基本维持不变,细菌的粘附是其形成生物被膜的前提条件。一旦细菌粘附到接触表面,粘附的细菌便会汲取周围的营养进行生长繁殖,进而形成生物被膜。在一定范围,较高

的菌体浓度会促进细菌在接触面的粘附,而较多粘附的细菌会促进生物被膜的形成<sup>[22]</sup>。不同碳源添加对荧光假单胞菌生物被膜的形成有促进作用,以 LB 培养基为对照培养基,添加六种碳源的 AB 培养基中荧光假单胞菌生物被膜产生量都高于 LB 培养基,其中以葡萄糖、麦芽糖为碳源时,生物被膜的产生量较高。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<sup>[23]</sup>。

不同碳源培养基添加 C<sub>4</sub>-HSL 信号分子标准品培养 24 h,以基础培养基 LB 培养基为阴性对照,添加信号分子标准品为阳性对照,其生物被膜产生量见图 5。添加碳源的 AB 培养基培养下,生物被膜产生量多于 LB 培养基,添加信号分子标准品的培养基生物被膜产生量都有明显提高,其中以葡萄糖和麦芽糖产生量居多。Nina 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<sup>[12]</sup>。QS 系统对荧光假单胞菌生物被膜的形成具有调控作用。

### 3.4 嗜铁素分析

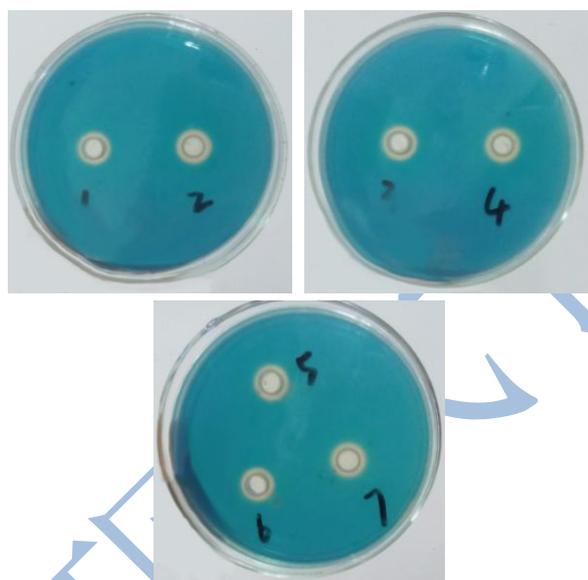


图 6 CASAD 检测平板法检测嗜铁素

Fig.6 Detection of siderophore production using CASAD plate assay

注: 1: 葡萄糖, 2: 蔗糖, 3: 果糖, 4: 木糖, 5: 乳糖, 6: 麦芽糖, 7: LB。

CASAD 嗜铁素平板法检测荧光假单胞菌 P001 嗜铁素晕圈结果如图 6 所示。在不同碳源的培养基中培养 24 h,离心,取菌液上清加入到孔中,嗜铁素会夺取蓝色平板中的铁离子,形成橙色晕圈,检测结果直观。1~7 编号分别为以葡萄糖、蔗糖、果糖、木糖、乳糖、麦芽糖为碳源的 AB 培养基和 LB 培养基培养

的菌液上清。以葡萄糖和乳糖为碳源时,产生的橙色晕圈稍大, CASAD 平板法是一种高效、便捷的定性检测嗜铁素的检测方法,能初步半定量的显示嗜铁素的含量,为了定量嗜铁素,我们采用 CAS 检测液方法。

嗜铁素可以使 CAS 蓝色液体检测液由蓝色变为橙黄色,不同浓度的嗜铁素使其变色程度不一样,通过测定混合液的吸光度来定量嗜铁素相对含量。如图 7 所示,荧光假单胞菌 P001 在以蔗糖和乳糖为碳源的 AB 培养基中培养时,产生的嗜铁素含量明显高于其他培养基,但并不是所有的碳源对嗜铁素的产生都有促进作用,以葡萄糖为碳源的 AB 培养基培养,嗜铁素含量低于 LB 培养基培养。通过向各培养基中添加 C<sub>4</sub>-HSL 信号分子标准品,发现嗜铁素的产生量均有明显提高,荧光假单胞菌通过分泌嗜铁素对环境中的铁离子的竞争来影响其他菌株的生长繁殖,有利于维持自身的种群密度。Alain Stintzi 等报道了铜绿假单胞菌通过群体感应调控嗜铁素的产生量<sup>[7]</sup>。荧光假单胞菌可能通过群体感应来调控嗜铁素的产量,进而增加自身在环境中的种群密度。

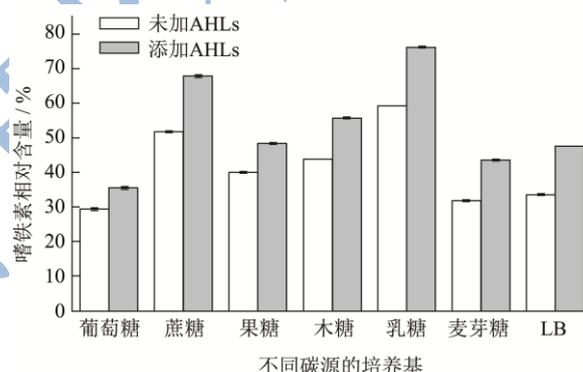


图 7 群体感应信号分子对荧光假单胞菌嗜铁素产生影响  
Fig.7 Influence of quorum-sensing signal molecules on the P001 siderophore production

### 3.5 胞外蛋白酶分析

荧光假单胞菌 P001 在不同碳源培养基培养下产胞外蛋白酶能力见图 8。大菱鲆是高蛋白低脂鱼,蛋白含量丰富,因此,只有蛋白水解酶丰富的腐败细菌,才能在此类产品中大量生长,水解鱼肉中的蛋白质,最终鱼肉腐败。检测结果显示,荧光假单胞菌产蛋白酶能力较强,它能分泌蛋白水解酶,在脱脂牛奶平板上形成明显的透明水解圈,碳源对蛋白酶的产生量影响不显著。1~7 编号分别以葡萄糖、蔗糖、果糖、木糖、乳糖、麦芽糖为碳源的 AB 培养基和 LB 培养基培养的菌液上清液。

添加外源信号分子标准品 C<sub>4</sub>-HSL 对荧光假单胞菌胞外蛋白酶产生量影响见图 9。添加外源的信号分

子标准品对荧光假单胞菌胞外蛋白酶的产生量有显著影响,其中,以果糖、乳糖为碳源的 AB 培养基和 LB 培养基培养时,胞外蛋白酶的产生量提高幅度最大,说明胞外蛋白酶的产生与 AHLs 有关。其它与食品腐败有关的腐败菌,如铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、液化沙雷氏菌 (*Serratia liquefaciens*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwini carotovora*) 蛋白酶活性的表达都是由 AHLs 调控的 [24~25]。



图8 荧光假单胞菌胞外蛋白酶检测

Fig.8 Detection of P001 extracellular protease production

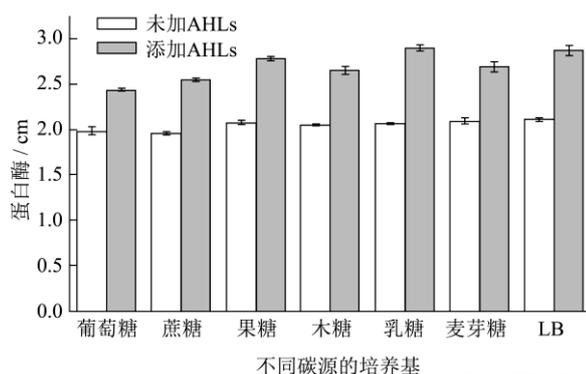


图9 群体感应信号分子对荧光假单胞菌胞外蛋白酶产生影响

Fig.9 Influence of quorum-sensing signal molecules on the P001 extracellular protease production

#### 4 结论

本研究利用检测菌株对从大菱鲆分离的荧光假单胞菌 P001 群体感应进行检测,发现 P001 具有群体感应现象,能够分泌 AHLs 类信号分子,使得紫色杆菌 CVO26 产生紫色反应;利用不同碳源的 AB 培养基对 P001 的生物被膜、嗜铁素和胞外蛋白酶的产生量进行研究,发现不同碳源培养对各个腐败因子的产生有影响,在添加外源 AHLs 标准品后,腐败因子的产生量有明显提高,说明 AHLs 与生物被膜、嗜铁素和胞外蛋白酶的产生有关,群体感应现象可能调控腐败特性的表达,并在食品腐败过程中发挥作用。

#### 参考文献

[1] Solano C, Echeverz M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing [J]. Current Opinion in Microbiology, 2014,

18: 96-104.

[2] 崔正翠,许钟,杨宪时,等.大菱鲆腐败菌生长动力学研究和货架期预测[J].海洋渔业,2010,4: 454-460

CUI Zheng-cui, XU Zhong, YANG Xian-shi, et al. Microbial growth kinetics model of spoilage organisms and shelf life prediction for *Scophthalmus maximus* [J]. Marine Fisheries, 2010, 4: 454-460

[3] 崔正翠,许钟,杨宪时,等.冷藏大菱鲆细菌组成变化和优势腐败菌[J].食品科学,2011,32(13):184-187

CUI Zheng-cui, XU Zhong, YANG Xian-shi, et al. Change of bacterial flora and predominant spoilage bacteria in *scophthalmus maximus* during chilled storage [J]. Food Science, 2011, 32(13): 184-187

[4] 陆静,卢士玲,刘玉晗,等.AHLs 对不同菌株产生物胺的影响及菌株生物被膜特性分析[J].现代食品科技,2014,30(10): 88-95

LU Jing, LU Shi-ling, LIU Yu-han, et al. Effect of N-acylhomoserine Lactones on Biogenic Amine Production from Bacteria and Analysis of Biofilm Formation Characteristics [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(10): 88-95

[5] Ammor M S, Michaelidis C, Nychas G-J E. Insights into the role of quorum sensing in food spoilage [J]. J. Food Protect, 2008, 71(7): 1510-1525

[6] Cha J Y, Lee J S, Oh J I, et al. Functional analysis of the role of Fur in the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*1528: Fur controls expression of genes involved in quorum-sensing [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 366(2): 281-287

[7] Stintzi A, Evans K, Meyer J, et al. Quorum - sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasRllasI mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis [J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 166(2): 341-345

[8] 周文渊,张宏梅,姜燕,等.腐败牛奶中三种细菌生物被膜特性探究[J].现代食品科技,2014,30(1): 87-90

ZHOU Wen-yuan, ZHANG Hong-mei, JIANG Yan, et al. Biofilm characteristics of several foodborne bacteria in spoiling milk [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(1): 87-90

[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] Mclean R J C, Pierson L S P, Fuqua C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 58: 351-360
- [12] Yunos N Y M, Tan W S, Koh C L, et al. *Pseudomonas cremoricolorata* strain ND07 produces N-acyl homoserine lactones as quorum sensing molecules [J]. *Sensors*, 2014, 14(7): 11595-11604
- [13] Zimmer B L, May A L, Bhedi C D, et al. Quorum sensing signal production and microbial interactions in a polymicrobial disease of corals and the coral surface mucopolysaccharide layer [J]. *PloS one*, 2014, 9(9): e108541
- [14] Rode TM, Langsrud S, Holck A, et al. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 116: 372-383
- [15] Shin S H, Lim Y, Lee S E, et al. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 44(1): 89-95
- [16] Schwyn B, Neiland JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores [J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160(1): 47-56
- [17] Machuca A, Milagres AM. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus* [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2003, 36(3): 177-187
- [18] Vijayaraghavan P, Vincent S G P. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye [J]. *J. Biochem. Tech.*, 2013, 4(3): 628-630
- [19] Yunos N Y M, Tan W S, Koh C L, et al. *Pseudomonas cremoricolorata* strain ND07 produces N-acyl homoserine lactones as quorum sensing molecules [J]. *Sensors*, 2014, 14(7): 11595-11604
- [20] 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
- [21] McLean R J C, Pierson III L S, Fuqua C. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 58(3): 351-360
- [22] Johnson L R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria [J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2008, 251 (1): 24-34
- [23] 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
- [24] Gram L, Ravn L, Rasch M, et al. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 78: 79-97
- [25] Gram L, Dalgaard P. Fish spoilage bacteria-problems and solutions [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, 13: 262-266