

乙醛对荧光假单胞菌的抑菌活性及机理

钱雄锋, 罗怡, 张岳玥, 李响, 鲁子铭, 刘梦月, 梁东武*

(广西大学轻工与食品工程学院, 广西南宁 530000)

摘要: 该研究通过分析乙醛对荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 菌体细胞膜完整性、膜电位、总蛋白含量、Na⁺K⁺-ATP酶变化以及细菌生物被膜的影响, 探究乙醛对 *P. fluorescens* 的抑菌活性及其抑菌机理。结果表明: 乙醛对 *P. fluorescens* 的最小抑菌浓度 MIC 值为 0.5 μL/mL, 最小杀菌浓度 MBC 值为 1 μL/mL; 电导率和二乙酸荧光素染色实验发现乙醛处理可引起 *P. fluorescens* 细胞膜出现破裂; 添加 1×MIC、2×MIC、4×MIC 乙醛 3 h 后降低菌体膜电位, 平均荧光强度从 72.10 AU 分别下降至 35.57、15.31 和 7.46 AU, 影响细菌的代谢活力; 不同浓度乙醛处理后胞内蛋白质的含量 3 h 内分别下降至 0.40、0.35 和 0.34 mg/mL, 3~12 h 期间呈现平缓、略有下降, 表示细胞膜的完整性遭到破坏; 乙醛降低了 Na⁺K⁺-ATP 酶活性, 导致胞内 ATP 代谢异常, 不能正常为细胞活动供给能量, 促使荧光假单胞菌的凋亡; 0.25 μL/mL 的乙醛对生物被膜形成抑制率为 30.11%, 显著降低 *P. fluorescens* 生物被膜形成。由此可见, 乙醛对 *P. fluorescens* 可能的抑菌机理是改变菌体细胞膜完整性, 为拓展水产品的防腐保鲜提供新思路。

关键词: 乙醛; 荧光假单胞菌; 抑菌活性; 抑菌机理; 水产品

文章篇号: 1673-9078(2022)01-104-111

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.1.1137

Bacteriostatic Activity of Acetaldehyde against *Pseudomonas fluorescens* and the Associated Mechanism

QIAN Xiong-feng, LUO Yi, ZHANG Yue-yue, LI Xiang, LU Ziming, LIU Meng-yue, LIANG Dong-wu*

(College of Light Industry and Food Engineering, Guangxi University, Nanning 530000, China)

Abstract: The effects of acetaldehyde on cell membrane integrity, membrane potential, total protein content, Na⁺K⁺-ATPase changes, and bacterial biofilm of *Pseudomonas fluorescens* were analyzed to investigate the bacteriostatic activity of acetaldehyde against *P. fluorescens* and its mechanism of action. Results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of acetaldehyde against *P. fluorescens* were 0.5 μL/mL and 1 μL/mL, respectively. Conductivity and fluorescein diacetate (FDA) staining experiments revealed that acetaldehyde treatment could cause cell membrane rupture in *P. fluorescens*. When *P. fluorescens* was cultured with acetaldehyde at 1×MIC, 2×MIC and 4×MIC, reduction in bacterial membrane potentials was observed after 3 h; the mean fluorescence intensity decreased from 72.10 AU to 35.57, 15.31, and 7.46 AU, respectively, indicating that the metabolic activity of the bacteria was affected. Intracellular protein content of *P. fluorescens* treated with acetaldehyde at different concentrations decreased to 0.40, 0.35, and 0.34 mg/mL within 3 h of treatment and exhibited a slight, gradual decrease between 3 h to 12 h, which demonstrated the destruction of cell membrane integrity. Acetaldehyde reduced the activity of Na⁺K⁺-ATPase, leading to abnormal intracellular ATP metabolism and the inability to provide a normal supply of energy for cellular activities, which ultimately promoted the apoptosis of *P. fluorescens*. The rate at which 0.25 μL/mL acetaldehyde inhibited biofilm formation was 30.11%, indicating a significant reduction in the biofilm formation of *P. fluorescens*. It can be inferred that the bacteriostatic activity of acetaldehyde against *P. fluorescens* is possibly exerted through the alteration of bacterial cell membrane integrity. Our results may provide a novel approach for the preservation and freshness retention of aquatic products.

引文格式:

钱雄锋, 罗怡, 张岳玥, 等. 乙醛对荧光假单胞菌的抑菌活性及机理[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1): 104-111, +125

QIAN Xiong-feng, LUO Yi, ZHANG Yue-yue, et al. Bacteriostatic activity of acetaldehyde against *Pseudomonas fluorescens* and the associated mechanism [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(1): 104-111, +125

收稿日期: 2021-10-14

基金项目: 广西重点研发计划项目 (AB18221117); 国家自然科学基金资助项目 (NSFC 31960484)

作者简介: 钱雄锋 (1995-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 抗菌材料, Email: fengxiongqian1995@126.com

通讯作者: 梁东武 (1981-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品包装材料与技术, Email: liangdongwu@gxu.edu.cn

Key words: acetaldehyde; *Pseudomonas fluorescens*; bacteriostatic activity; bacteriostatic mechanism; aquatic product

微生物活动是造成食品腐败的重要原因之一, 每年可导致世界四分之一的食物腐败损失; 其中, 捕捞后的鱼类约有 30% 因为微生物腐败变质而丧失食用价值^[1]。嗜冷微生物是水产品中常见的腐败微生物, 其生长繁殖常常加速水产品冷链储运中的品质下降。研究表明, 冷藏淡水鱼类的优势腐败菌主要是假单胞菌属细菌^[2], 如荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)。 *P. fluorescens* 是一种革兰氏阴性菌, 是较典型的嗜冷菌, 在冷藏水产品常见。*P. fluorescens* 能产生脂肪酶, 可导致水产品的脂肪氧化酸败和变质。此外, *P. fluorescens* 也是水产养殖中常见的病原菌, 常常粘附在鱼类体表形成生物被膜, 通过生理代谢、基因表达和蛋白质表达的改变, 以及降低代谢率和细胞分裂率来适应缺氧、营养或抗生素等环境限制^[3,4]。

植物精油是芳香植物合成的次级代谢产物, 主要由萜烯化合物、酸、醇、酯、醛、酮等芳香化合物组成。目前研究表明, 植物精油具有广泛的抗菌和抗氧化特性, 可通过提高细菌细胞内外渗透压差来破坏细胞壁和细胞质膜结构, 从而进一步影响脂肪酸、多糖和磷脂双分子层的构象, 实现抑制细菌生长繁殖、抑制细菌生物被膜和毒力因子形成等^[5]。植物精油来源广泛, 作为抗菌剂是目前抗菌材料研究的热点和发展趋势^[6-7]。

乙醛 (Acetaldehyde) 是近年来研究较多的天然植物精油抗菌剂之一, 研究人员已经证明己醛是一种抗菌化合物^[8]。研究发现, 己醛能够破坏细胞膜形成和线粒体功能并诱导黄曲霉等真菌凋亡^[9]。除了抗菌特性外, 乙醛还能阻断超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性^[10]。在适当浓度下乙醛具有青草味, 对中国对虾的整体香气影响很小, 不会改变虾肉的味道^[11]。乙醛在抑制 *P. fluorescens* 的生长繁殖尤其是其生物被膜的形成方面的作用逐渐引起了研究者的关注。例如, 乙醛抑制白色念珠菌中酵母菌向菌丝的转化和生物被膜形成^[12]。

大量的研究都表明了乙醛的良好抑菌性, 但有关乙醛抑制 *P. fluorescens* 的机理研究尚少。因此, 本实验首先通过测定乙醛的最小抑菌浓度和最小杀菌浓度, 制定抑菌生长曲线, 评价乙醛对 *P. fluorescens* 的抑菌能力; 其次, 通过 *P. fluorescens* 电导率、胞外总蛋白含量和胞内 Na^+K^+ -ATP 酶活性的测定、生物被膜的观察和二乙酸荧光素染色实验, 深入分析乙醛对 *P. fluorescens* 细胞膜完整性、生物被膜的影响, 阐明乙醛对 *P. fluorescens* 的抑菌机理, 为水产品保鲜技术研究及应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

(1) 菌种: 荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 来源于北纳创联生物科技有限公司, 于 28 °C、150 r/min 摇床中培养。

(2) 试剂: 乙醛 (纯度 97%) 购于上海麦克林生化科技有限公司; 信号分子 C₆-HSL 来源于美国 Sigma 公司; 胰酪大豆胨琼脂培养基 (TSA)、胰酪大豆胨液体培养基 (TSB) 购于青岛高科园海博生物技术有限公司; 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBS) 购于广东环凯微生物科技有限公司; ATP 酶 (Na^+K^+) 测试盒购于齐一生物科技 (上海) 有限公司。

1.2 主要仪器设备

FA 系列多功能电子天平, 上海力辰仪器科技有限公司; XFS-40M 电热式压力蒸汽灭菌器, 浙江新丰医疗器械有限公司; BPMJ 恒温恒湿培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; SW-CJ-2F 超净台, 苏州安泰空气技术有限公司; Agilent 8453 紫外-可见光分光光度计, 安捷伦科技有限公司; infinite M200 PRO 酶标仪, 广西南宁市博美生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 最小抑菌浓度和最小杀菌浓度的测定

参考 Yang 等^[13]的方法略作修改, 测定乙醛对荧光假单胞菌的最小抑菌浓度。吸取培养至对数生长期 (10^7 CFU/mL) 的荧光假单胞菌菌液 100 μL 加到 96 孔细胞培养板中, 再将溶于 50% 乙醇的乙醛溶液加入到上述孔中, 使乙醛的终浓度分别为 32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 和 0.125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。以等体积的乙醇 (50%) 为阴性对照, 8 μL 卡那霉素 (浓度为 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) 为阳性对照。将 96 孔细胞培养板放在 28 °C 恒温恒湿培养箱中培养 24 h, 并使用酶标仪测定 OD_{595 nm} 值。通过对 OD_{595 nm} 测定值比较, 选择与阳性对照无明显差异的乙醛浓度作为乙醛对荧光假单胞菌的最小抑菌浓度。

将 96 孔细胞培养板中清澈的菌液吸取 100 μL 用 PBS 稀释, 菌悬液按 0.5、1、2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 接种至无菌的 TSA 平板均匀涂布后置于 28 °C 恒温培养箱中培养 24 h, 以平板上无肉眼可见细菌生长的乙醛浓度为乙醛对

荧光假单胞菌的最小杀抑菌浓度 (MBC)。

1.3.2 生长曲线的测定

吸取 100 μL 培养至对数生长期 (10^7 CFU/mL) 的荧光假单胞菌菌液于 10 mL TSB 培养基中, 加入乙醛使其终浓度分别为 $1\times\text{MIC}$ 、 $2\times\text{MIC}$ 、 $4\times\text{MIC}$, 以无菌去离子水作为空白对照。在 28 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中分别培养 0、2、4、6、8、10、12 h, 用酶标仪测定 595 nm 处的吸光值 (A)。

1.3.3 乙醛对细菌细胞膜完整性的影响

根据卢群等^[14]二乙酸荧光素 (Fluorescein diacetate, FDA) 染色方法略作修改。取培养至对数生长期的荧光假单胞菌菌液, 离心去上清并用 PBS 重悬菌体, 加入乙醛使其终浓度为 $1\times\text{MIC}$ 、 $2\times\text{MIC}$ 、 $4\times\text{MIC}$, 以无菌去离子水做空白对照, 于摇床培养。分别取培养 3、6、9、12 h 的菌悬液各 5 mL 以 $8000\times\text{g}$ 离心 10 min, 去除上清液, 留下的菌体用 PBS 重悬 3 次, 离心后去除上清液, 加入 250 μL 溶于丙酮的二乙酸荧光素 (2 mg/mL), 常温下静置 15 min, PBS 重悬洗涤三次, 离心弃上清液 PBS 重悬。使用荧光分光光度测定平均荧光强度 (激发波长为 297 nm, 发射波长为 527 nm, 激发狭缝与发射狭缝为 5 nm)。

1.3.4 电导率分析

取过夜培养至对数生长期的荧光假单胞菌液, $8000\times\text{g}$ 离心 10 min, 去除上清液, 留菌体后用 PBS 重悬菌体, 再以 $8000\times\text{g}$ 离心 10 min, 重复两次。最终菌体重悬于磷酸盐缓冲液, 用酶标仪测定 OD_{595} nm 值, 调平其吸光度值。加入溶于乙醇的乙醛, 使其终浓度分别为 $1\times\text{MIC}$ 、 $2\times\text{MIC}$ 、 $4\times\text{MIC}$, 以无菌去离子水作为空白对照。于摇床中培养 12 h, 期间每 2 h 取样测电导率。

1.3.5 膜电位的测定

根据 Zhang 等^[15]的荧光染色法 (“罗丹明 123”) 适当修改。细菌的膜电位 (MP) 的大小可反映细胞的能量代谢活性, 为了研究乙醛对荧光假单胞菌代谢活性变化的影响, 将培养至对数期的菌悬液中分别加入 $1\times\text{MIC}$ 、 $2\times\text{MIC}$ 和 $4\times\text{MIC}$ 浓度的乙醛, 以 50% 乙醇为空白对照, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 摇床培养 3 h。离心后收集菌体, 再用 PBS 洗涤 2 次后并溶解。将罗丹明 123 加入 PBS 中配置成 1 mg/mL 母液, 加入菌液中使其终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在黑暗中静置 30 min 后, 将样品洗涤 3 次并重悬于 PBS 中, 用荧光分光光度计测定平均荧光强度 (激发波长为 480 nm, 发射波长为 530 nm)。

1.3.6 乙醛对荧光假单胞菌细胞蛋白含量的影响

将 *P. fluorescens* 培养至对数生长期 (10^7 CFU/mL), 吸取上清留下层菌体, 加入 PBS 中重复离心, 重悬洗涤两次, 再加入乙醛使其终浓度为 $1\times\text{MIC}$ 、 $2\times\text{MIC}$, 以无菌去离子水做空白对照, 于摇床中 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养。分别取 0、3、6、9、12 h 的 10 mL 菌悬液离心去上清留菌体, 加入 PBS。用超声波细胞粉碎机在 300 W 功率下冰水浴中破碎菌体, 每次超声时间为 5 s, 间隔 3 s, 重复三次并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用总蛋白定量测定试剂盒中的 BCA 法得到各组样品的蛋白浓度, 并用紫外-可见分光光度计于 562 nm 下测定其吸光度值。

1.3.7 乙醛对 Na^+K^+ -ATP 酶活力的影响

取培养至对数生长期 (10^7 CFU/mL) 的荧光假单胞菌菌液, 去除上清并于菌体中加入 PBS, 重悬两次后置于生理盐水中, 加入终浓度分别为 $1\times\text{MIC}$ 和 $2\times\text{MIC}$ 的乙醛, 以无菌去离子水做空白对照, 放在 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养 12 h。期间分别取 0、3、6、9、12 h 菌悬液样品, 离心去除上清液加入 PBS 重悬三次, 用超声破碎仪破碎细胞。采用超微量 Na^+K^+ -ATP 酶试剂盒测定荧光假单胞菌内 Na^+K^+ -ATP 酶含量, 用紫外-可见分光光度计于 636 nm 下测定其吸光度。

1.3.8 乙醛对荧光假单胞菌生物被膜的影响

1.3.8.1 乙醛对荧光假单胞菌生物被膜形成量的影响

参考 Lee 等^[16]的方法并稍加修改。将培养至对数期的荧光假单胞菌以体积比为 1:1000 接种于 TSB 肉汤, 加入终浓度为 0.016、0.031、0.062、0.125 和 0.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的乙醛, 分别以体积分数 50% 的乙醇和信号分子 $\text{C}_6\text{-HSL}$ 为阴性和阳性对照。取 200 μL 混合菌液加入 96 孔板, 放入 28 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中静置培养 48 h, 然后取出菌液测定菌液密度 (波长 595 nm); 弃去菌液, 用无菌水清洗 96 孔板 3~5 次, 用无菌风干燥 30 min, 使生物被膜固定在 96 孔板内壁, 同时取 200 μL 0.1% (ρ) 结晶紫对其染色 15 min。弃去染色液, 再用无菌水清洗 3~5 次至干净透明, 用 33% 冰乙酸溶解残留的染色液。用酶标仪测定波长 595 nm 下溶解液的吸光度, 每处理组取 3 个重复去平均值。生物被膜的相对形成量计算公式如下:

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

式中:

$\text{OD}_{595\text{nm}}$ ——处理组指乙醛处理后测得的生物被膜;

$\text{OD}_{595\text{nm}}$ ——阴性对照组指添加体积分数 50% 的乙醇后测得的生物被膜。

1.3.8.2 乙醛对荧光假单胞菌生物被膜的影响

参考 Li 等^[17]的方法并稍加修改。将锌片用砂纸除

去表面的氧化层,用剪到裁成 10 mm×10 mm 大小的正方形,置于无水乙醇和去离子水中先、后超声 30 min,烘干后灭菌备用。后续操作与酶标仪法测生物被膜形成量相同。培养后取出锌片用 PBS 冲洗去除游离细菌,冲洗 3~5 次后置于 4 °C 预冷的 2.5%戊二醛溶液中浸泡 4 h,再用 50%、70%、90%乙醇进行梯度洗脱,100%无水乙醇脱水 2 次,乙酸异戊酯置换 2 次。干燥后进行喷金处理,利用扫描电子显微镜来观察生物被膜的形态。

1.4 数据统计与分析

采用 SPSS 26.0 进行数据方差分析,显著性水平 $p < 0.05$ 。所有样品均进行 3 次重复,实验结果以“平均值±标准差”显示。

2 结果与讨论

2.1 乙醛对荧光假单胞菌的最小抑菌浓度

(MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC)

采用微量稀释法测定不同浓度乙醛对荧光假单胞菌的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MBC),评估其抑菌效果。如图 1 所示,不同浓度的乙醛对荧光假单胞菌均有抑制作用,并随着乙醛浓度增加,其抑菌作用增大。对培养至对数期的荧光假单胞菌采用 0.5 μL/mL 的乙醛处理后,菌液密度低于等体积的卡那霉素阳性对照,表明乙醛对荧光假单胞菌的最小抑菌浓度为 0.5 μL/mL。此外,乙醛对荧光假单胞菌的最小杀菌浓度为 1 μL/mL。与 Zhang 等^[18]研究的没食子酸对 *P. fluorescens* 的抗菌功效相比,乙醛对 *P. fluorescens* 具有较好的抑菌效果。

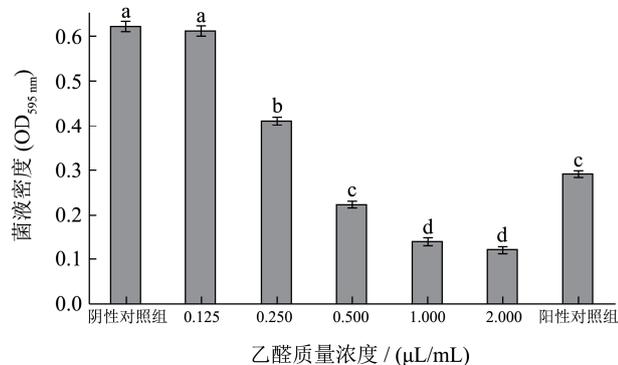


图 1 不同浓度的乙醛对荧光假单胞菌抑菌效果

Fig.1 Bacteriostatic effect of acetaldehyde with different concentration on *Pseudomonas fluorescens*

2.2 乙醛对荧光假单胞菌增殖速度的影响

乙醛对荧光假单胞菌增殖速度的影响可说明乙醛对荧光假单胞菌的抑菌能力。从图 2 荧光假单胞菌的增殖曲线可知,培养 6 h 后 *P. fluorescens* 达到对数生长后期,12 h 后达到平台期。与空白对照相比,经过浓度分别为 1×MIC、2×MIC、4×MIC 的乙醛处理后,荧光假单胞菌的生长和繁殖均被显著抑制。何学文等^[9]研究发现 1×MIC 和 2×MIC 浓度的肉桂醛在沙门氏菌生长前期增殖有抑制作用,随着培养时间增加,抑制作用降低;4×MIC 浓度的肉桂醛能完全抑制沙门氏菌的增殖。可见,随着培养时间的增加,不同浓度的乙醛对荧光假单胞菌的抑菌能力与其它抑菌剂相比较稳定,至少在 24 h 内抑制荧光假单胞菌的增殖。

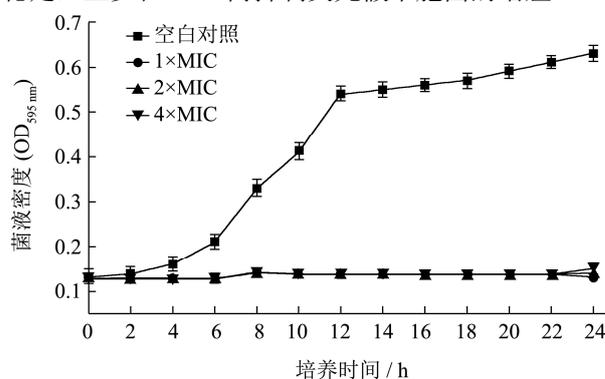


图 2 乙醛对荧光假单胞菌生长的影响

Fig.2 Effect of acetaldehyde on the growth of *Pseudomonas fluorescens*

2.3 乙醛对荧光假单胞菌细胞膜结构完整性的影响

的影响

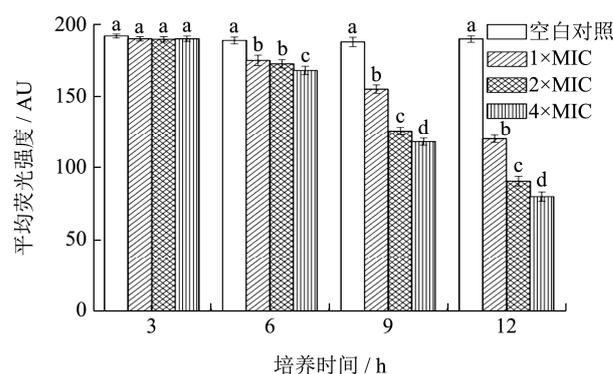


图 3 乙醛对荧光假单胞菌 FDA 荧光强度的影响

Fig.3 Effect of acetaldehyde on fluorescence intensity of FDA from *Pseudomonas fluorescens*

当荧光假单胞菌细胞膜被破坏时可引起荧光的泄漏,并引起二乙酸荧光素 (FDA) 的荧光强度降低,因此可以用 FDA 的荧光强度来表征细胞膜完整性。图 3 显示,不同浓度乙醛处理 3 h 后,各组的荧光强度与空白对照相近,均为 190 AU 左右,无显著性差

异 ($p>0.05$), 表明此时细胞膜结构仍然保持完整。乙醛处理 6 h、9 h 或 12 h, FDA 荧光强度均有下降, 其中 4×MIC 乙醛在 12 h 处理 FDA 降至 81 AU, 此时样品下降幅度最大, 而不同处理时间空白对照组 FDA 荧光强度几乎不变。由此可见, 随着乙醛浓度的增加, 处理时间延长, 细胞膜结构受破坏程度越大, 这与 Wang 等^[20]的研究相符。

2.4 电导率的变化

细菌细胞膜的电导率的大小与细胞膜结构的完整性呈正相关关系。当细胞膜结构的完整性被破坏时, 其通透性增加, 可引起胞内 K^+ 、 Na^+ 、 H^+ 等离子经细胞膜外泄, 进而影响细菌的正常的运动、代谢以及溶质转运等^[21]生理活动。从图 3 可知乙醛处理后荧光假单胞菌细胞膜结构受损, 因此, 在此基础上结合电导率的测得, 可以进一步分析乙醛对荧光假单胞菌细胞膜结构的影响。图 4 显示, 不同浓度乙醛处理 (8 h) 内均导致荧光假单胞菌细胞膜电导率快速增大, 且显著大于空白对照组; 细胞膜电导率增幅随着乙醛浓度的增加而增大 (4×MIC 乙醛处理样品电导率增幅最大), 表明乙醛可影响荧光假单胞菌的细胞膜通透性, 引起胞内离子的外泄。乙醛处理 8 h 至 12 h 期间, 各样品电导率变化均趋于平缓, 可能与此阶段荧光假单胞菌的溶解与死亡有关。杨胜平等^[22]研究牛至精油处理后 *P. fluorescens* 培养液电导率上升, 细菌失去了原有的细胞形态, 说明牛至精油处理破坏了 *P. fluorescens* 细胞膜完整性, 使细胞内容物泄露, 降低了 *P. fluorescens* 对细胞膜流动性的调控能力。

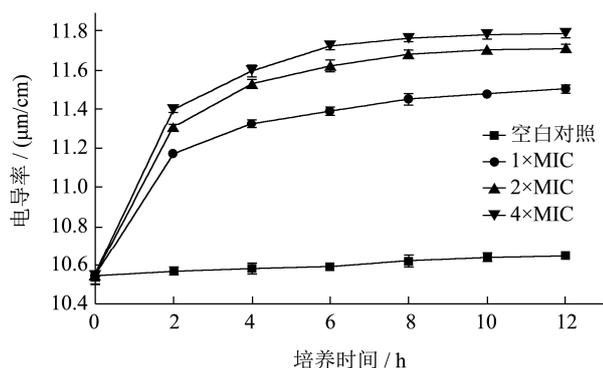


图 4 乙醛对荧光假单胞菌电导率的影响

Fig.4 Effect of acetaldehyde on electrical conductivity of *Pseudomonas fluorescens*

2.5 乙醛对荧光假单胞菌膜电位的影响

膜电位反映细菌细胞代谢活力, 作为质子动力势的一部分参与腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 的合成^[23]。而细胞膜电位的变化可引起荧光光强度变化, 因此,

可以用荧光强度表征膜电位的变化。如图 5 所示, 当乙醛浓度为 1×MIC 时, 荧光假单胞菌菌液的平均荧光强度从空白对照的 72 AU 下降至 35.57 AU, 随着乙醛浓度增加, 平均荧光强度进一步下降, 浓度越大平均荧光强度下降程度越大。舒慧珍等^[24]研究发现荧光假单胞菌的膜电位下降后, 促使细胞代谢失常和去极化。由此可见, 乙醛处理降低了荧光假单胞菌的膜电位, 可能降低细菌的代谢活力。

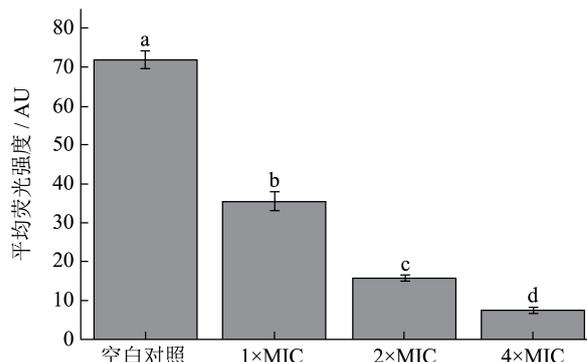


图 5 乙醛对荧光假单胞菌膜电位的影响

Fig.5 Effect of acetaldehyde on *Pseudomonas fluorescens* membrane potential

2.6 乙醛对荧光假单胞菌细胞蛋白含量的影响

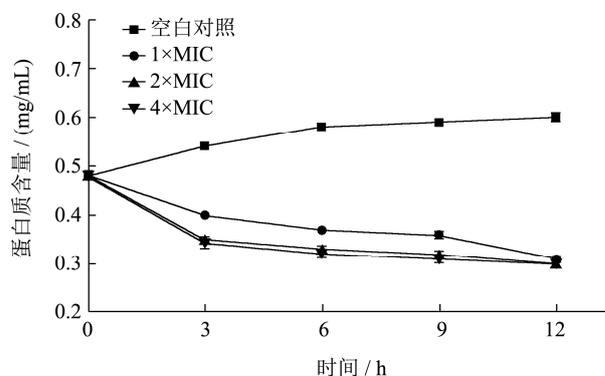


图 6 乙醛对荧光假单胞菌细胞内蛋白质含量的影响

Fig.6 Effect of acetaldehyde on intracellular protein content of *Pseudomonas fluorescens*

蛋白质是生命的重要基础, 蛋白质的变化可直接影响细胞的生物活性^[25]。如图 6 所示, 与空白对照组蛋白质含量则随着时间延长而缓慢增加的趋势不同, 不同浓度的乙醛处理 (1×MIC、2×MIC 和 4×MIC) 3 h 内均导致胞内蛋白质的含量迅速下降, 分别下降至 0.40、0.35 和 0.34 mg/mL; 乙醛处理 3~12 h 期间蛋白质含量变化呈现平缓、略有下降, 其中 1×MIC 处理后蛋白含量为 0.31 mg/mL, 2×MIC 和 4×MIC 处理组的蛋白质含量变化趋势基本一致。荧光假单胞菌细胞蛋白质的变化与细胞能量代谢等重要生命活动密切相关, 乙醛处理可降低荧光假单胞菌细胞蛋白质的含量,

影响蛋白质的代谢。Shen 等^[26]研究表明肉桂醛会破坏大肠杆菌和金黄色葡萄球菌细胞内蛋白质的合成, 从而影响细胞的生长与代谢, 影响了细胞膜的完整性, 与本研究结果相同。

2.7 乙醛对荧光假单胞菌内 Na⁺K⁺-ATP 酶活力的影响

腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 的合成和分解代谢是细胞维持稳态的重要机制, 而 Na⁺K⁺-ATP 酶作为一种位于细胞质膜磷脂双分子层中的蛋白酶, 它参与了为细胞代谢直接提供能量的 ATP 的水解催化过程, 在细胞物质运输、能量转化、膜电位调节及信息传递等方面均具有重要作用^[27,28]。如图 7 所示, 空白对照组样品在培养时间内胞内 Na⁺K⁺-ATP 酶活力呈现先增强后减弱的趋势, 其中活力增强可能是由于前 6 h 内荧光假单胞菌增殖的结果; 而 1×MIC、2×MIC 乙醛处理 6 h 菌内 ATP 酶活力降至 31.36 和 28.12 U/mg, 随着培养时间延长 Na⁺K⁺-ATP 酶的活力逐渐下降, 12 h 降至 26.33 和 22.17 U/mg。Zhang 等^[29]研究了迷迭香酸会显著降低大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌胞内三磷酸腺苷的释放。因此, 可推测乙醛降低 Na⁺K⁺-ATP 酶活性后胞内 ATP 代谢异常, 不能正常为细胞活动供给能量, 导致荧光假单胞菌的凋亡。

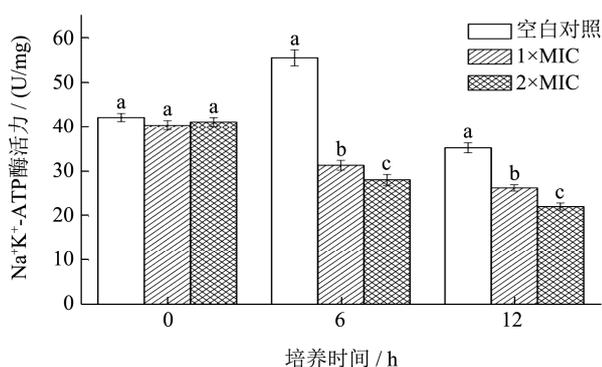


图 7 乙醛对荧光假单胞菌内 Na⁺K⁺-ATP 酶活力的影响

Fig.7 Effect of acetaldehyde on Na⁺K⁺-atpase activity in *Pseudomonas fluorescens*

2.8 乙醛对荧光假单胞菌生物被膜的影响

2.8.1 乙醛对荧光假单胞菌生物被膜形成率的影响

如图 8 所示, 当乙醛浓度为 0.016 μL/mL 时, 其荧光假单胞菌生物被膜相对形成率为 91.20%; 而当乙

醛浓度为 0.25 μL/mL 时, 其生物被膜相对形成率下降至 30.11%; 与未加处理对照组相比, 不同浓度的乙醛均能抑制荧光假单胞菌生物被膜的形成; 而添加外源 C₆-HSL 信号分子可促进该菌生物被膜的形成。信号分子是细菌生物被膜形成的关键影响因素, 这提示我们, 乙醛有可能通过对信号分子的干扰, 进而抑制生物被膜的形成, 与 Ahmad 等^[30]的研究结果相符合。Topa 等^[31]研究表明亚抑菌浓度肉桂醛对铜绿假单胞菌的生长不产生影响, 破坏了铜绿假单胞菌种间信息交流过程中预先形成的生物被膜; 当肉桂醛的浓度为 0.5×MIC 时, 生物被膜的形成率仅为 24.40%, 抑制率达到 75.60%。因此, 可以推测乙醛可以影响 *P. fluorescens* 生物被膜的结构, 对细菌的扩散式增殖进行抑制。

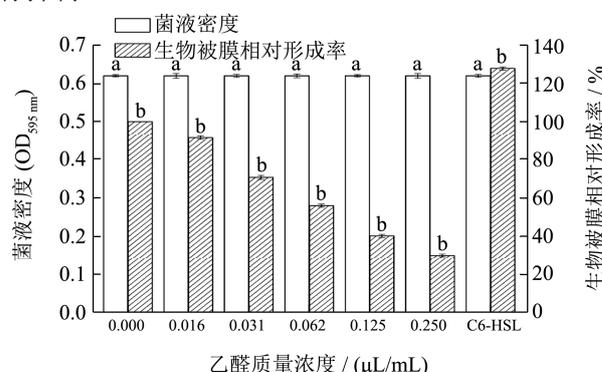


图 8 乙醛对荧光假单胞菌生物被膜形成率的影响

Fig.8 Effect of acetaldehyde on biofilm formation rate of *Pseudomonas fluorescens*

2.8.2 乙醛对荧光假单胞菌生物被膜的影响

生物被膜的功能与其结构密不可分, 通过干扰荧光假单胞菌的聚集能减少细菌增殖^[32]。本研究利用扫描电子显微镜观察乙醛处理对 *P. fluorescens* 生物被膜结构的影响。由图 9a 显示, 相比于阴性对照组, 添加信号分子 C₆-HSL 后锌片表面形成的生物被膜浓厚且致密, 这表明 *P. fluorescens* 生物被膜的形成可能受到信号分子的调控。图 9c~9f 经过不同乙醛浓度处理, 细菌数量随着乙醛浓度的增加而显著减少, 且菌体呈现出无规则排列分布状态, 无法形成聚集的细菌团簇, 而且粘附在锌片表面的细菌数量也明显减少, 与王硕等^[33]的研究结果相符合。綦国红等^[34]研究发现肉桂醛在低于 MIC 浓度下, 通过光学显微镜进行观察发现铜绿假单胞菌生物被膜的形成具有抑制作用。因此, 推测乙醛可能通过干扰荧光假单胞菌的聚集来减少生物被膜的形成。

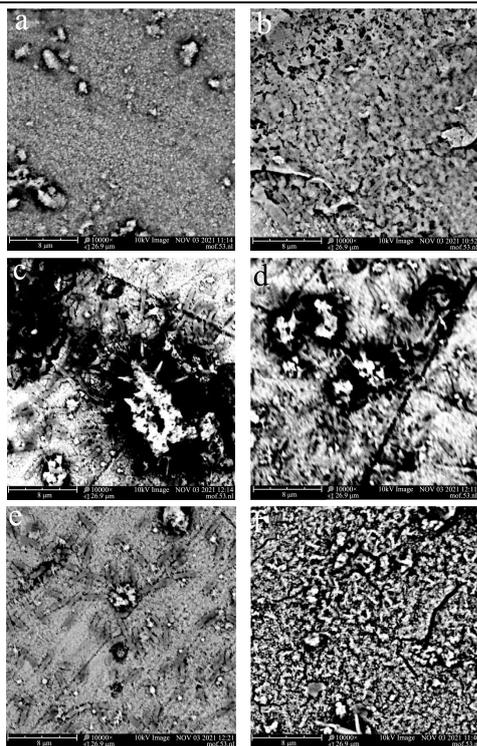


图9 乙醛对荧光假单胞菌生物被膜影响的扫描电子显微镜图

Fig.9 Scanning electron microscopic images of effects of *Pseudomonas fluorescens* biofilm of acetaldehyde

注: a: 阳性处理组; b: 阴性对照组; c: 0.25 $\mu\text{L/mL}$ 乙醛; d: 0.125 $\mu\text{L/mL}$ 乙醛; e: 0.062 $\mu\text{L/mL}$ 乙醛; f: 0.031 $\mu\text{L/mL}$ 乙醛。

3 结论

本文深入研究乙醛对荧光假单胞菌的抑菌活性及机理,验证了乙醛在亚抑菌浓度下是具有抑制生物被膜特性。研究发现,乙醛对荧光假单胞菌的生长于繁殖具有较强的抑制作用,在24 h内抑制荧光假单胞菌的增殖。乙醛可通过破坏荧光假单胞菌细胞膜的完整性,增加膜的通透性和电导率,降低胞内蛋白质含量和抑制ATP分解代谢相关酶活性,全面破坏荧光假单胞菌的生命物质基础、正常生理活动及能量代谢。此外,乙醛能够在低于 $1\times\text{MIC}$ 浓度下有效抑制荧光假单胞菌生物被膜形成过程及形态,可能与荧光假单胞菌分泌的群体感应信号分子有关,具体机理有待进一步通过转录组学、分子对接等手段研究探明。

参考文献

[1] Ghaly. Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: review [J]. American Journal of Applied Sciences, 2010, 7(7): 859-877

[2] 许振伟,李学英,杨宪时,等.冷藏鲤鱼和罗非鱼优势腐败菌腐败能力分析[J].食品科学,2012,33(4):243-246

XU Zhenwei, LI Xueying, YANG Xianshi, et al. Analysis of spoilage ability of dominant spoilage bacteria from stored chilled *Cyprinus carpio* and *Oreochromis niloticus* [J]. Food Science, 2012, 33(4): 243-246

[3] Sillankorva S, Neubauer P, Azeredo J. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A [J]. BMC Biotechnology, 2008, 8: 79

[4] Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, et al. Bacterial biofilm and associated infections [J]. Journal of the Chinese Medical Association, 2018, 81(1): 7-11

[5] Hu F, Tu X, Thakur K, et al. Comparison of antifungal activity of essential oils from different plants against three fungi [J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 134: 110821

[6] 老莹,胡文忠,冯可,等.天然抑菌剂的抑菌机理及其在果蔬保鲜中的应用[J].食品与发酵工业,2018,44(9):288-293

LAO Ying, HU Wenzhong, FENG Ke, et al. Application of natural antimicrobial agents on fruits and vegetables preservation and its mechanism [J]. Food and Fermentation Industries, 2018, 44(9): 288-293

[7] AbouAitah K, Piotrowska U, Wojnarowicz J, et al. Enhanced activity and sustained release of protocatechuic acid, a natural antibacterial agent, from hybrid nanoformulations with zinc oxide nanoparticles [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(10): 5287

[8] Shi C, Jash A, Lim L. Activated release of hexanal and salicylaldehyde from imidazolidine precursors encapsulated in electrospun ethylcellulose-poly (ethylene oxide) fibers [J]. S N Applied Sciences, 2021, 3(3): 1-13

[9] Zhang S, Qin Y, Li S, et al. Antifungal mechanism of 1-nonanol against *Aspergillus flavus* growth revealed by metabolomic analyses [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2021: 1-18

[10] Caballero-Prado C J, Merino-Mascorro J A, Heredia N, et al. Eugenol, citral, and hexanal, alone or in combination with heat, affect viability, biofilm formation, and swarming on Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* [J]. Food Science and Biotechnology, 2021, 30(4): 599-607

[11] Chen L, Zeng W, Rong Y, et al. Characterization of taste - active compositions, umami attributes and aroma compounds in Chinese shrimp [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2021, 56: 6311-6321

[12] Chauhan N M, Raut J S, Mohan Karuppaiyl S. Acetaldehyde inhibits the yeast-to-hypha conversion and biofilm formation in *Candida albicans* [J]. Mycoscience, 2011, 52(5): 356-360

[13] Yang S, Shin S Y, Hahm K, et al. Design of perfectly

- symmetric Trp-rich peptides with potent and broad-spectrum antimicrobial activities [J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2006, 27(4): 325-330
- [14] 卢群,丘泰球,杨红.Rh123、FDA荧光法测定超声作用对大肠杆菌细胞膜的影响[J].*广东药学院学报*,2006,2:179-180
LU Qun, QIU Taiqiu, YANG Hong. Determination of ultrasound-induced alterations of *Escherichia coli* membrane with FDA and Rh123 fluorescent methods [J]. *Journal of Guangdong Pharmaceutical University*, 2006, 2: 179-180
- [15] Zhang Y, Liu X, Wang Y, et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Food Control*, 2016, 59: 282-289
- [16] Lee J, Park J, Cho H S, et al. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus* [J]. *Biofouling*, 2013, 29(5): 491-499
- [17] Li T, Wang D, Liu N, et al. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* by cinnamaldehyde [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 269: 98-106
- [18] 周倩倩,方士元,梅俊,等.丁香酚对腐败希瓦氏菌和荧光假单胞菌的抑制机理[J].*食品科学*,2020,41(9):1-6
ZHOU Qianqian, FANG Shiyuan, MEI Jun, et al. Inhibitory mechanism of eugenol on *Shewanella putrefaciens* and *Pseudomonas fluorescens* [J]. *Food Science*, 2020, 41(9): 1-6
- [19] Zhang R, Shi Y, Gu Q, et al. Antimicrobial effect and mechanism of non-antibiotic alkyl gallates against *Pseudomonas fluorescens* on the surface of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2021, 342: 109093
- [20] Wang Y, Zhang Y, Shi Y, et al. Antibacterial effects of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil on *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 116: 26-32
- [21] 张赧彬,刘笑宇,姜萍萍,等.肉桂醛对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌作用及抑菌机理研究[J].*现代食品科技*,2015,31(5):31-35
ZHANG Yunbin, LIU Xiaoyu, JIANG Pingping, et al. Mechanism and antibacterial activity of cinnamaldehyde against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(5): 31-35
- [22] 杨胜平,章缜,程颖,等.牛至精油对荧光假单胞菌的抑制作用及其对冷藏三文鱼品质的影响[J].*食品科学*,2020,41(1):215-222
YANG Shengping, ZHANG Zhen, CHENG Ying, et al. Inhibitory effect of oregano essential oil against spoilage microorganism *Pseudomonas fluorescens* and its influence on quality changes during chilled storage of salmon [J]. *Food Science*, 2020, 41(1): 215-222
- [23] 石超,郭都,张文婷,等.原儿茶醛对阪崎克罗诺杆菌的抑制作用及机理[J].*现代食品科技*,2017,33(7):105-111
SHI Chao, GUO Du, ZHANG Wenting, et al. Inhibitory effect and mechanism of protocatechualdehyde on *Enterobacter sakazakii* [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(7): 105-111
- [24] 舒慧珍,唐志凌,刘雪,等.柠檬烯对荧光假单胞菌抑菌活性及机理研究[J].*食品工业科技*,2019,40(12):134-140
SHU Huizhen, TANG Zhiling, LIU Xue, et al. Antibacterial activity and mechanism of limonene against *Pseudomonas fluorescens* [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(12): 134-140
- [25] Yin L, Chen J, Wang K, et al. Study the antibacterial mechanism of cinnamaldehyde against drug-resistant *Aeromonas hydrophila* in vitro [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 145: 104208
- [26] Shen S, Zhang T, Yuan Y, et al. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane [J]. *Food Control*, 2015, 47: 196-202
- [27] Ke R, Xu Q, Li C, et al. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism [J]. *Cell Biology International*, 2018, 42(4): 384-392
- [28] 王梦洁,储天琪,刘峰,等.盐度胁迫对小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)抗氧化酶,非特异性免疫酶和 Na^+/K^+ -ATP酶活力的影响[J].*海洋学报*,2021,43(2):59-66
WANG Mengjie, CHU Tianqi, LIU Feng, et al. Effect of salinity stress on the antioxidant enzymes, non-specific immune enzymes, and Na^+/K^+ -ATPase activities in *Larimichthys polyactis* [J]. *Haiyang Xuebao*, 2021, 43(2): 59-66
- [29] Jinhua Z, Xin C, Min Z, et al. The antibacterial mechanism of perilla rosmarinic acid [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2021
- [30] Ahmad A, Viljoen A M, Chenia H Y. The impact of plant volatiles on bacterial quorum sensing [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 60(1): 8-19
- [31] Topa S H, Subramoni S, Palombo E A, et al. Cinnamaldehyde disrupts biofilm formation and swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Microbiology*, 2018, 164(9): 1087-1097