

肉桂醛对荧光假单胞菌生物膜形成的抑制作用

綦国红, 井佳丽, 杨志萍, 陈贵堂, 王海翔, 程抒劼
(中国药科大学工学院, 江苏南京 211198)

摘要:本文拟研究肉桂醛在非抑菌浓度条件下对荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) FML05-2 生物膜形成的抑制作用。首先测定了肉桂醛对模式细菌紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*) CVO26 紫色素产生的影响;再对荧光假单胞菌 FML05-2 形成的生物膜以及与生物膜形成有关的重要因素胞外多糖进行了测定。结果表明:在非抑菌浓度 40、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 条件下,肉桂醛对紫色杆菌 CVO26 紫色素的产生具有抑制作用,抑制率分别为 31.53%、17.90%;对荧光假单胞菌 FML05-2 生物膜形成的抑制率分别为 44.22%、21.77%;对荧光假单胞菌 FML05-2 胞外多糖产生的抑制率分别为 15.72%、5.34%。因此,肉桂醛在非抑菌浓度条件下对荧光假单胞菌 FML05-2 生物膜的形成具有抑制作用。

关键词:肉桂醛,群体感应抑制,荧光假单胞菌,生物膜,胞外多糖

Inhibition of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* by cinnamaldehyde

QI Guo-hong, JING Jia-li, YANG Zhi-ping, CHEN Gui-tang, WANG Hai-xiang, CHENG Shu-jie

(School of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: To study the inhibition of development of biofilm in *Pseudomonas fluorescens* FML05-2 by cinnamaldehyde at the non inhibitory concentration. Firstly, it was studied that the effect of the cinnamaldehyde on the purple pigment production by *Chromobacterium violaceum* CVO26 as model bacteria, then determined the biofilm formation and extracellular polysaccharide (EPS) production that was important factors correlated with the biofilm formation in *P. fluorescens* FML05-2. The results indicated that the cinnamaldehyde inhibited the purple pigment production of *C. violaceum* CVO26, the inhibition rates were 31.53% and 17.90%, respectively. The inhibition rates of the biofilm development were 44.22%, 21.77%, the inhibition rates of EPS production were 15.72%, 5.34% in *P. fluorescens* FML05-2 at the non inhibitory concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results suggest that the cinnamaldehyde can inhibit the development of biofilm in *P. fluorescens* FML05-2 at the non inhibitory concentration

Key words: cinnamaldehyde; quorum sensing inhibition; *Pseudomonas fluorescens*; biofilm; extracellular polysaccharide

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2017)21-0147-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2017.21.030

细菌生物膜(biofilm, BF)是细菌为了适应环境和维持自身生命而形成的形如膜状的结构,保护膜内细菌免受外界恶劣环境的影响,为细菌生长提供天然屏障。食品腐败菌以及食源性致病菌常常通过形成生物膜附着在食品、食品加工设备、包装材料等表面,难以消杀与清除,从而形成持续性的污染,成为食品安全的一大隐患^[1-2]。因此研究如何减少食源性致病菌与食品腐败菌生物膜的形成具有重要意义。研究表明细菌生物膜的形成受群体感应现象调控^[3-5],因此可以通过群体感应抑制原理来减少或抑制生物膜的产生,此方法不同于基于抑菌与杀菌而抑制目标菌生物膜的形成原理,不会导致抗性菌

株的产生。目前研究较多的群体感应抑制方法是利用群体感应抑制剂即群体感应信号分子的类似物来干扰群体感应现象,从而减少或抑制由群体感应现象调控的目标性状的表达^[6-7]。

肉桂醛(cinnamaldehyde),又名桂皮醛,有独特的香味,是肉桂挥发油的主要活性物质。研究表明,肉桂醛对食源性致病菌大肠杆菌、李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌以及导致番茄、胡萝卜等霉变的霉菌等均具有很好的抑制作用^[8-10];对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、烟曲霉菌等产生的生物膜也具有抑制作用^[8,10]。国外文献报道,肉桂醛对欧文氏菌、耶尔森氏菌的群体感应系统具有抑制作用^[11],但对荧光假

收稿日期:2016-12-23

作者简介:綦国红(1972-),女,博士,副教授,研究方向:食品微生物与生物技术,E-mail:qghepu@163.com。

基金项目:细菌群体感应对鱼虾腐败过程的调控作用及其分子机制(30700627)。

单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 群体感应抑制作用目前国内外未见报道。

荧光假单胞菌是一种典型的嗜冷菌,是导致食品腐败的常见细菌,多数菌株生长过程中产生生物膜。且该菌生物膜的形成受其自身群体感应系统调控^[12-13]。本文基于群体感应抑制的原理研究肉桂醛在非抑菌浓度条件下对荧光假单胞菌生物膜形成的抑制作用,研究的视角不同于已有的研究,即在抑菌条件下对食品腐败菌生物膜形成的抑制作用,从而揭示肉桂醛对荧光假单胞菌群体感应的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

菌种与培养条件:荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) FML05-2 产生生物膜与 N-酰基高丝氨酸内酯类信号分子^[12];紫色杆菌 (*Chromobacterium violaceum*) CVO26,是工程菌株,不产生 N-己酰高丝氨酸内酯,也不产生紫色色素,并且色素的产生受 N-己酰高丝氨酸内酯 (N-hexanoyl-homoserine lactone, C6-HSL) 信号分子的调控^[12]。二者均使用 LB 培养基(氯化钠 10 g,胰蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,蒸馏水 1 L, pH7.0)于 28 ℃ 150 r/min 振荡培养。紫色杆菌 CVO26 培养时添加卡那霉素至终浓度为 20 μg/mL。

肉桂醛分析标准品 ≥99.5% (GC) Aladdin 试剂公司; C6-HSL Sigma 公司;硫酸卡那霉素注射液 四川华蜀动物药业有限责任公司;二甲基亚砜 (AP) 上海泰坦化学有限公司;苯酚 (AP) 国药集团化学试剂有限公司;浓硫酸 (AP) 南京化学试剂股份有限公司。

FLX800 多功能酶标仪 美国伯腾仪器有限公司; TU-1901 双光束紫外可见分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司; Microscope Eclipse 80i 光学显微镜 日本 Nikon; CR21G 高速冷冻离心机 日立高新技术公司; HZC-250 恒温振荡培养箱 苏州太仓实验设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肉桂醛溶液的制备 取 2.00 mg 肉桂醛溶于 1 mL 1% 的二甲基亚砜溶液中,得到浓度为 2000 μg/mL 的肉桂醛母液, -20 ℃ 保存备用。肉桂醛测试浓度用无菌 LB 培养基对母液按比例进行稀释。

1.2.2 对紫色杆菌 CVO26、荧光假单胞菌 FML05-2 最小抑菌浓度 (MIC) 的测定 参照文献^[4]将活化好的菌液按 2% 比例接种于无菌新鲜 LB 培养基中,培养至菌体密度 OD_{600 nm} 约为 0.4,取 4.5 mL 的菌液分装于标记好的无菌大试管中,加入 0.5 mL 不同浓度的肉桂醛溶液,对照组为等量无菌 LB 培养基,于 28 ℃, 150 r/min 振荡培养 24 h,观察菌液是否浑浊,同时测定菌液 OD_{600 nm} 值,确定 MIC。

1.2.3 对紫色杆菌 CVO26、荧光假单胞菌 FML05-2 的生长抑制作用 参照文献^[4],按 1.2.2 方法制备含有不同浓度肉桂醛的菌液,分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 时取 200 μL 培养液加入 96 孔板中,用酶标仪

测定 OD_{600 nm} 值,取三次测量数值的平均值,绘制生长曲线。

1.2.4 对紫色杆菌 CVO26 紫色素产生的抑制作用 参照文献^[5]按 1.2.2 方法制备含有不同浓度肉桂醛的 CVO26 菌液,肉桂醛的最终质量浓度为 20、40 μg/mL,对照组为无菌 LB 培养基。同时添加 C6-HSL 至终浓度为 5 μmol/mL,于 28 ℃, 150 r/min 振荡培养约 7 h。取 3 mL 培养液 10000 r/min 4 ℃ 离心 10 min,弃上清,加入 3 mL 二甲基亚砜,充分混匀。10000 r/min 4 ℃ 离心 10 min,取上清,分光光度计测定 580 nm 吸光度。按下式计算紫色素抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = (\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}) / \text{对照组 OD 值} \times 100$$

1.2.5 对荧光假单胞菌 FML05-2 生物膜形成的抑制作用 光学显微镜对生物膜的定性观察,根据文献^[5],按 1.2.2 方法制备含有不同浓度肉桂醛的菌液,分装于锥形瓶中,将 1.5 cm × 1.5 cm 的无菌玻璃片置于锥形瓶内,28 ℃ 静置培养 48 h 后,弃培养液,添加含有肉桂醛的新鲜 LB 培养基后继续静置培养 48 h。取出玻璃片,无菌水冲洗表面浮菌,45 ℃ 干燥 30 min, 0.2% 的结晶紫溶液染色 2 min。无菌水洗掉多余的染色剂,45 ℃ 干燥 30 min。用光学显微镜观察,拍照。对生物膜的定量测定,参照文献^[6],按上述方法操作,无菌输液管片代替玻璃片。输液管片 45 ℃ 干燥后,用无水乙醇洗脱 3 min,取 200 μL 洗脱液加入 96 孔板中,酶标仪测定 490 nm 处的吸光度。按 1.2.4 方法计算抑制率。

1.2.6 对荧光假单胞菌 FML05-2 胞外多糖的抑制作用 按 1.2.2 的方法制备含有肉桂醛的菌液,28 ℃ 振荡培养 24 h。取菌液 10000 r/min 4 ℃ 离心 30 min,取上清,加入上清液 3 倍体积的冷乙醇,4 ℃ 静置 24 h, 12000 r/min 4 ℃ 离心 10 min,得沉淀,2 倍体积的蒸馏水稀释沉淀,参照苯酚硫酸法^[14]进行测定,即 2 mL 样品溶液加入 1 mL 5% 的苯酚溶液,再加入 5 mL 的浓硫酸,充分摇匀,静置 30 min 后于 490 nm 处测量吸光度,蒸馏水对照,按 1.2.4 方法计算抑制率。

2 结果与分析

2.1 对紫色杆菌 CVO26 和荧光假单胞菌 FML05-2 最小抑菌浓度 (MIC)

观察紫色杆菌 CVO26 与荧光假单胞菌 FML05-2 在含有不同浓度肉桂醛的培养基中的生长情况,同时测定培养物的 OD_{600 nm} 值,确定紫色杆菌 CVO26 的 MIC 为 100 μg/mL,荧光假单胞菌 FML05-2 的 MIC 为 150 μg/mL。

2.2 对紫色杆菌 CVO26 和荧光假单胞菌 FML05-2 生长抑制作用

为进一步验证肉桂醛在 MIC 浓度以下对 CVO26 的抑制作用,对其生长曲线进行了测定,并与对照进行了显著性检验,结果表明(图 1),肉桂醛浓度 ≤40 μg/mL 时,紫色杆菌 CVO26 的生长趋势与对照组无显著差异 ($p > 0.05$),即肉桂醛在此浓度下对其生长没有抑制作用;而肉桂醛浓度 ≥50 μg/mL 时,生

长情况与对照相比有显著差异 ($p < 0.05$) ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上浓度数据未显示)。

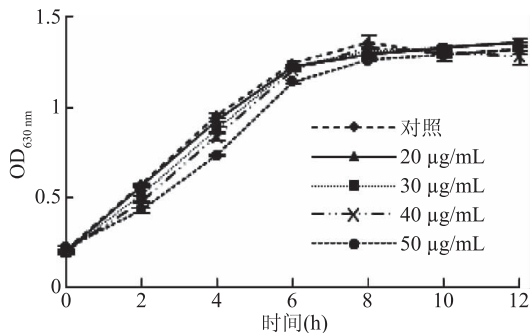


图1 肉桂醛对 CVO26 的生长抑制作用

Fig.1 The growth inhibition of cinnamaldehyde to CVO26

用同样的方法,对荧光假单胞菌 FML05-2 的生长曲线进行了测定和分析,结果(图2)表明,肉桂醛浓度在 $\leq 40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时对荧光假单胞菌 FML05-2 生长无抑制作用,与对照无显著性差异 ($p > 0.05$),而浓度为 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 FML05-2 生长具有抑制作用,与 CVO26 一样其抑制作用主要发生在对数生长期,而到达稳定期时菌液的 $\text{OD}_{630 \text{ nm}}$ 值与对照无显著差异。因此后续肉桂醛对二菌的测试浓度均确定为 $\leq 40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

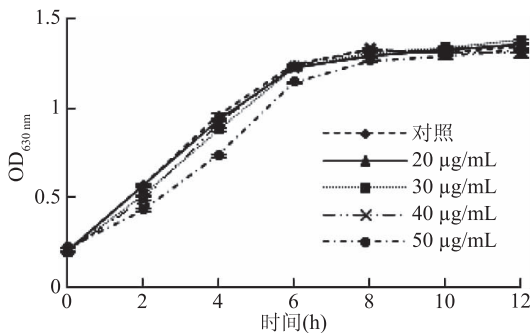


图2 肉桂醛对 FML05-2 的生长抑制作用

Fig.2 The growth inhibition of cinnamaldehyde to FML05-2

2.3 对紫色杆菌 CVO26 紫色素产生的抑制作用

由图3可知,肉桂醛在非抑菌浓度条件下对 CVO26 紫色素的产生具有抑制作用,并且随肉桂醛浓度的增加紫色素的抑制率也随之增加,浓度为 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑制率达 31.53%。

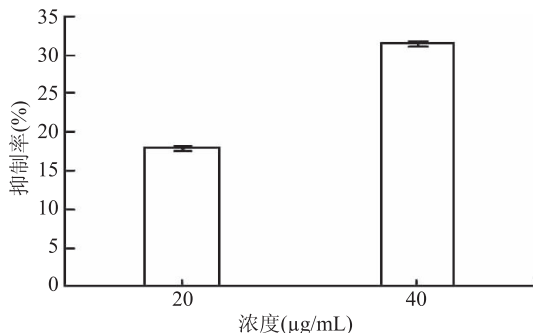


图3 肉桂醛对 CVO26 紫色素产生的抑制作用

Fig.3 Violacein production inhibition in CVO26 by cinnamaldehyde

2.4 对荧光假单胞菌 FML05-2 生物膜产生的抑制作用

利用光学显微镜在 400 倍条件下对细胞爬片上的生物膜形态进行观察,结果表明(图4),肉桂醛对荧光假单胞菌 FML05-2 生物膜的形成具有抑制作用,生物膜上的细胞密度、细胞团块的大小随着肉桂醛浓度的升高而降低。当肉桂醛浓度为 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,膜上细胞密度变得很稀疏。为进一步验证肉桂醛对生物膜的抑制作用,进行了定量测定。结果如图5所示,生物膜的抑制率随着肉桂醛浓度的升高而增大, $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到 44.22%,与显微镜观察结果相吻合。

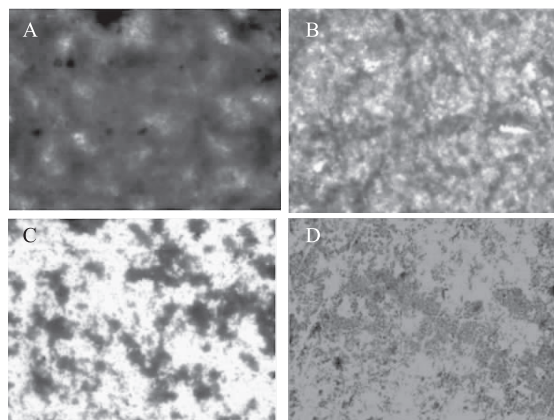


图4 肉桂醛对 FML05-2 生物膜形成的抑制作用(400 ×)

Fig.4 Inhibition of cinnamaldehyde on biofilm formation of FML05-2(400 ×)

注:A:对照;B: $20 \mu\text{g}/\text{mL}$;C: $30 \mu\text{g}/\text{mL}$;D: $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

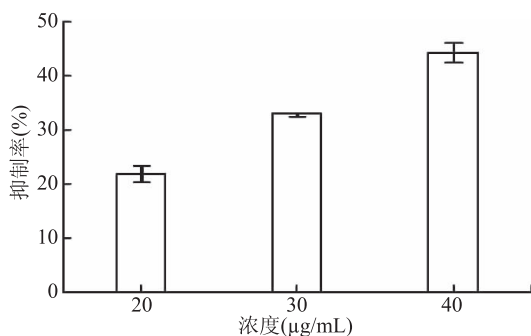


图5 肉桂醛对 FML05-2 生物膜形成的抑制作用

Fig.5 Inhibition of cinnamaldehyde on biofilm formation of FML05-2

2.5 对荧光假单胞菌 FML05-2 胞外多糖产生的抑制作用

胞外多糖是构成生物膜的重要成分,影响生物膜产生的因素也会影响胞外多糖的产生,因此对荧光假单胞菌 FML05-2 胞外多糖的产生进行了测定,由图6可知,肉桂醛在不抑制荧光假单胞菌生长的情况下对其胞外多糖的产生具有抑制作用,且随着浓度增加,抑制率随之增加, $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时抑制率为 15.72%。

3 结论

本文首先利用群体感应抑制研究的模式菌紫色

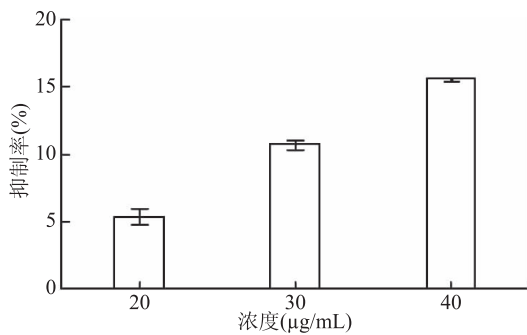


图6 肉桂醛对FML05-2胞外多糖产生的抑制作用

Fig.6 Inhibition of EPS production to FML05-2 by cinnamaldehyde

杆菌 CVO26 对肉桂醛的群体感应抑制活性进行了初步测定,发现肉桂醛具有抑制其紫色素产生的能力,40 µg/mL 时抑制率为 31.53%。然后研究了肉桂醛在非抑菌浓度条件下对荧光假单胞菌 FML05-2 生物膜形成的抑制作用,发现肉桂醛处理导致生物膜结构松散,细胞密度与细胞团块大小明显降低;对生物膜定量测定结果表明 40 µg/mL 时生物膜抑制率为 44.22%;对生物膜的主要构成成分胞外多糖进行测定,40 µg/mL 时胞外多糖的抑制率为 15.72%。因此,肉桂醛对荧光假单胞菌 FML05-2 生物膜形成具有抑制作用,此种作用不是由于肉桂醛对 FML05-2 抑制生长所致,而是通过对其群体感应抑制作用所致。

参考文献

- [1] 张曙梅,徐向荣,徐浩.细菌生物膜群体感应系统研究进展[J].生物技术通报,2016,32(12):1-6.
- [2] 张翼,陈雅蘅,周帼萍,等.克罗诺杆菌(原阪崎肠杆菌)的生物膜检测和药敏性分析[J].食品科学,2015,36(21):129-134.
- [3] You J L, Xue X L, Cao L X, et al. Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(5): 1137-1144.
- [4] Packiavathy I A S V, Agilandeswari P, Musthafa K S, et al. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin-

- An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa* [J]. *Food Chemistry*, 2014, 148: 453-460.
- [5] Abraham S V P I, Palani A, Ramaswamy B R, et al. Anti-quorum sensing and antibiofilm potential of *Cappariis spinosa* [J]. *Archives of Medical Research*, 2011, 42: 658-668.
- [6] Packiavathy I A S V, Agilandeswari P, Musthafa k S, et al. Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminumcyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens [J]. *Food Research International*, 2012, 45: 85-92.
- [7] Rasmussen T B, Bjarnsholt T, Skindersoe M E, et al. Screening for Quorum-Sensing Inhibitors (QSI) by Use of a Novel Genetic System, the QSI Selector [J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(5): 1799-1814.
- [8] 张赞彬,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.
- [9] 索标,卢杨柳,王娜,等.肉桂醛对猪肉糜中单核细胞增生李斯特菌的抑制作用及其机制[J].食品安全质量检测学报,2016,7(6):2211-2214.
- [10] 邹丽红,陈一强,孔晋亮,等.肉桂醛对烟曲霉菌体外生物膜的影响[J].重庆医学,2016,45(3):326-328.
- [11] Truchado P, Tomás-Barberán F A, Larrosa M, et al. Food phytochemicals act as Quorum Sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora* [J]. *Food Control*, 2012, 24: 78-85.
- [12] 綦国红,董明盛,陈晓红,等.鱼源假单胞菌群体感应信号分子与腐败特性相关关系研究[J].中国农业科学,2007,40(7):1486-1491.
- [13] Myszka K, Schmidt M T, Majcher M, et al. Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 114: 252-259.
- [14] 张惟杰.糖复合物生化研究技术[M].杭州:浙江大学出版社,1994:102.
- [15] (上接第146页)
- 对白酒液态发酵效率和风味物质的影响[J].微生物学通报,2012,39(7):921-930.
- [17] You L, Wang S, Zhou R P, et al. Characteristics of Yeast Flora in Chinese Strong Flavour Spirit Fermentation in Yibin Region, China [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2016, 122(7): 517-523.
- [18] 杜礼泉,王远成,蒲浩,等.活性干酵母在红糟、丢糟中的应用研究[J].酿酒科技,2006,2006(11):78-80.
- [19] 中国国家标准化管理委员会.浓香型白酒:GB/T 10781.1-2006[S].北京:中国标准出版社,2006:2-4.
- [20] You L, Wang T, Yang Z R, et al. Performance of indigenous yeasts in the processing of Chinese strong-flavoured liquor during spontaneous mixed solid-state or submerged fermentation [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2015, 121(121): 295-303.
- [21] 马雷,沈小梅,李安军.超高效液相色谱法测定白酒中乳酸的含量[J].食品与发酵科技,2015,52(1):84-86.
- [22] Zhu D, Tanabe S, Yang C, et al. Bacterial community composition of South China Sea sediments through Pyrosequencing-Based analysis of 16S rRNA genes [J]. *Plos One*, 2013, 8(10): 1-9.
- [23] 吴徐建.酱香型白酒固态发酵过程中酵母与细菌群落结构变化规律的研究[D].无锡:江南大学,2013:37-55.
- [24] 廖永红,沈晗,石文娟,等.产香酵母碳源利用及发酵产香特性初步研究[J].食品与发酵工业,2010,36(2):1-7.
- [25] 张继冉,方芳,陈坚,等.鲁氏接合酵母对酱油中氨基甲酸乙酯前体物的代谢[J].微生物学报,2016,56(6):956-963.