

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2021101206

喻红霞, 刘晓薇, 汪慧香, 等. 微塑料生物膜 11 种 AHLs 类群体感应信号分子测定及其分泌特征[J]. 环境化学, 2022, 41(3): 785-792.
YU Hongxia, LIU Xiaowei, WANG Huixiang, et al. Determination and secretion characteristics of 11 *N*-acyl-homoserine lactones signal molecules of quorum sensing in microplastic biofilms[J]. Environmental Chemistry, 2022, 41 (3): 785-792.

微塑料生物膜 11 种 AHLs 类群体感应 信号分子测定及其分泌特征*

喻红霞^{1,2} 刘晓薇^{1,2} 汪慧香³ 王静³ 俞志敏^{1,2} 邓呈迅^{1,2}**

(1. 合肥学院生物食品与环境学院, 合肥, 230601; 2. 安徽省生物质(中德)国际联合研究中心, 合肥, 230601; 3. 合肥工业大学资源与环境工程学院, 合肥, 230009)

摘要 为研究微塑料生物膜的群体感应效应, 利用液液萃取和超高效液相色谱-串联质谱技术, 建立了微塑料上枯草芽孢杆菌生物膜分泌的 11 种酰基高丝氨酸内酯(AHLs)类群体感应信号分子前处理和仪器分析方法. 优化后的前处理方法采用酸化的乙酸乙酯(0.01%冰乙酸, *V/V*)对微塑料生物膜样品中 AHLs 类信号分子进行萃取, 萃取方式采用冰浴超声. 微塑料生物膜中 AHLs 回收率为 50.6%—128.1%, 相对标准偏差($n=3$)为 0.2%—10.6%. 对色谱和质谱条件进行优化, 11 种 AHLs 在 0.5—50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系($R^2 > 0.995$), 检出限为 0.005—0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 定量限为 0.01—0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. 本方法具有快速、准确、灵敏度高等优点. 对聚丙烯、聚乙烯、聚苯乙烯等 3 种微塑料上枯草芽孢杆菌生物膜中 11 种 AHLs 分析结果表明, C8-HSL、C12-HSL 和 3-oxo-C10-HSL 在 3 种微塑料生物膜中均被检出; C12-HSL 的产生量最高, 且在聚乙烯表面生物膜中含量最高达 34 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$. 通过添加外源信号分子研究表明, AHLs 分子浓度增加会促进微塑料生物膜形成.

关键词 超高效液相色谱-串联质谱, 生物膜, 群体感应, 酰基高丝氨酸内酯, 微塑料.

Determination and secretion characteristics of 11 *N*-acyl-homoserine lactones signal molecules of quorum sensing in microplastic biofilms

YU Hongxia^{1,2} LIU Xiaowei^{1,2} WANG Huixiang³ WANG Jing³
YU Zhimin^{1,2} DENG Chengxun^{1,2}**

(1. School of Biology, Food, and Environment, Hefei University, Hefei, 230601, China; 2. International (Sino-German) Joint Research Center for Biomass of Anhui Province, Hefei, 230601, China; 3. School of Resources and Environmental Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, 230009, China)

Abstract In order to study the quorum sensing effect of biofilms on microplastics, a pretreatment and instrumental analysis method for 11 *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) secreted by *Bacillus subtilis* biofilms on microplastics was established by liquid-liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The optimized pretreatment method used acidified ethyl acetate (0.01% glacial acetic acid, *V/V*) to extract AHLs signal molecules from microplastic biofilm samples. The extraction method used ultrasound with ice bath. The recoveries of 11 AHLs in microplastic biofilms ranged from 50.6% to 128.1%, and the relative standard deviations

2021年10月12日收稿(Received: October 12, 2021).

* 国家自然科学基金(52070063)和巢湖生物资源调查及生态修复示范工程(2021BFFBZ01571)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (52070063) and Biological Resources Investigation and Ecological Restoration Demonstration Project for Chaohu Lake (2021BFFBZ01571).

** 通信联系人 **Corresponding author**, Tel: 0551-62158450, E-mail: dcx@hfuu.edu.cn

($n = 3$) ranged from 0.2% to 10.6%. After the optimization for chromatographic and mass spectrometry condition, the linearities of 11 AHLs were good in the range of 0.5—50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($R^2 > 0.995$), the limits of detection were in the range of 0.005—0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the limits of quantification were in the range of 0.01—0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The method is rapid and accurate, and has high sensitivity. The quantitative analysis for 11 AHLs in *Bacillus subtilis* biofilms on polypropylene, polyethylene and polystyrene showed that C8-HSL, C12-HSL and 3-oxo-C10-HSL were all detected in the three types of microplastic biofilms; the production amount of C12-HSL was the highest, and was up to 34 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ in polyethylene biofilm. The result from the addition of exogenous AHLs indicated the increasing concentrations of AHLs can promote the biofilm formation on microplastics.

Keywords UPLC-MS/MS, biofilm, quorum sensing, AHLs, microplastics.

塑料的广泛使用使得进入环境的塑料越来越多,随着时间的推移逐渐在水体中积累^[1]. 微塑料因其尺寸小、比表面积大、疏水性高等表面特性,使得微生物更容易黏附在其表面而形成异质性结构的生物膜^[2]. 在生物膜形成过程中,较高的细菌密度会产生能够与受体蛋白做出有效反应的群体感应(quorum sensing)信号^[3]. 群体感应是细菌达到一定浓度阈值时通过信号分子分泌、识别,调节基因表达、协调菌群行为的一种细胞交流机制^[4]. 这种机制赋予细菌一系列社会性能力,包括生物发光、生物膜形成^[5]、基因水平转移^[6-7]等. 群体感应通过多个“信号通路”调节胞外多聚物的产生,从而控制生物膜的形成^[8]. 生物膜的形成与群体感应有着较强的关联性. 微塑料在水环境中大量存在具有时间尺度的持久性、空间尺度的高传输性,还可通过食物链在生态系统中传递的特点,其表面的生物膜上的生态位点富集了很多潜在的致病菌^[9]. 研究微塑料生物膜群体感应信号分子分泌特征以及信号分子对生物膜形成的调节作用,为探究微塑料生物膜形成过程中群体感应的调控作用机制提供研究基础,同时为治理水环境中微塑料污染提供一种新的思路.

厚壁菌门在微塑料生物膜中常被发现^[10]. 从属于厚壁菌门的枯草芽孢杆菌能够分泌产生酰基高丝氨酸内酯(AHLs)类群体感应信号分子^[11],该类信号分子广泛存在于微生物界的群体中. 目前,对生物膜中 AHLs 类群体感应信号分子鉴定方法通常包括传统的薄层色谱法^[12]、气相色谱质谱法^[13]. 因液相色谱-串联质谱法检测快速、准确性和灵敏度高等优点,近年来被多项研究应用于 AHLs 的定性与定量^[14-17]. 由于生物膜产生的信号分子浓度往往低于仪器检出限,需对样品进行浓缩富集. 常用的富集方法包括固相萃取(SPE)^[18]、液液萃取(LLE)^[19]、固相萃取串联液相萃取(SPE-LLE)^[20]. SPE 和 SPE-LLE 通常适用于基质影响较大的环境样品^[15],由于培养体系中枯草芽孢杆菌生物膜基质干扰相对较小,本研究选用萃取过程相对简单和经济的 LLE 方法.

本研究针对生物膜上常检出的 3-oxo-C6-HSL、C6-HSL 和 3-oxo-C8-HSL 等 11 种 AHLs 类信号分子^[20-22],采用 LLE 作为样品的前处理方法,通过对萃取方式和萃取液进行优化来提高微塑料枯草芽孢杆菌生物膜中 AHLs 回收率,基于超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱(UPLC-MS/MS)仪器分析平台,优化色谱质谱分析条件,建立一种快速、准确的微塑料生物膜中 AHLs 类群体感应信号分子检测方法. 使用所建立的方法来测定在生活生产使用最多且水环境中常被检出的聚丙烯(polypropylene, PP)、聚乙烯(polyethylene, PE)、聚苯乙烯(polystyrene, PS)的 3 种微塑料^[23]上生物膜群体感应分泌的 11 种 AHLs 类信号分子,并研究其分泌特征. 同时,添加外源信号分子来初步探究群体感应信号分子分泌量对生物膜成膜的影响. 研究多种 AHLs 类信号分子化合物的同时定性与定量分析,能为微生物群体感应的进一步研究提供有效且便利的分析方法.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 试剂和仪器

本研究采用内标法对目标物进行定量,目前尚无研究报道枯草芽孢杆菌产生 C7-HSL,因此选择 C7-HSL 作为定量目标 AHLs 的内标物. 11 种 AHLs 类信号分子标准品 *N*-(3-氧代己酰)-*DL*-高丝氨酸内酯(3-oxo-C6-HSL)、*N*-己酰基-*L*-高丝氨酸内酯(C6-HSL)、*N*-(3-氧代辛酰基)-*L*-高丝氨酸内酯(3-oxo-C8-HSL)、*N*-辛酰基-*DL*-高丝氨酸内酯(C8-HSL)、*N*-(3-氧代癸酰基)-*L*-高丝氨酸内酯(3-oxo-C10-

HSL)、*N*-癸酰基-*L*-高丝氨酸内酯(C10-HSL)、*N*-(3-氧代十二烷酰基)-*L*-高丝氨酸内酯(3-oxo-C12-HSL)、*N*-(3-氢氧化十二酰基)-*DL*-高丝氨酸内酯(3-OH-C12-HSL)、*N*-十二烷酰-*L*-高丝氨酸内酯(C12-HSL)、*N*-(3-氧代十四烷酰)-*L*-高丝氨酸内酯(3-oxo-C14-HSL)和正十四酰基-*DL*-高丝氨酸内酯(C14-HSL)和内标物 C7-HSL 均购于 Sigma 公司(纯度大于 98%); 实验所用的聚丙烯、聚乙烯和聚苯乙烯(直径为 3.2 mm 的球形)均购于阿拉丁公司; K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 、 NH_4Cl 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2$ 、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (分析纯)购于上海生工公司; 甲醇(色谱纯)购于 Tedia 公司; 甲酸(纯度 99%)购于 Anaqua 公司; 乙酸乙酯(分析纯)、冰乙酸(分析纯)均购于国药集团; LB 培养基、营养琼脂等购于上海生工公司; 实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

使用的设备仪器主要包括 UPLC-MS/MS(Xevo TQ-S, 美国 Waters); 高速离心机(Centrifuge 5810, 德国 Eppendorf); 超声细胞破碎机(JY92-II, 宁波新芝); 旋转蒸发仪(RE-100, 北京大龙); 恒温培养箱(ZWYR-2102, 上海智诚); 涡旋仪(MX-S, 美国 SCILOGEX); 紫外分光光度计(UV 9100A, 北京莱伯泰科)。

1.2 主要试剂配制

分别将 11 种信号分子标准品用甲醇配制成 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准储备液, 取出 1 mL 用甲醇和水($V:V=1:1$)配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的中间混合标准溶液。标准工作溶液按照需要用甲醇和水($V:V=1:1$)对中间混合标准溶液进行梯度稀释。内标物 C7-HSL 用甲醇溶解, 配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的内标物溶液。所有配制好的溶液放置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。

用无菌蒸馏水分别配置成含 K_2HPO_4 (21.75 g)、 KH_2PO_4 (8.5 g)、 $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (33.4 g)和 NH_4Cl (0.5 g)的溶液 A(调至 $\text{pH} = 7.4$)、含 22.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 的溶液 B、27.5 g $CaCl_2$ 的溶液 C、0.25 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 的溶液 D, 并分别定容至 1 L。量取 10 mL 溶液 A 与 800 mL 无菌蒸馏水混合, 分别加入 1 mL 溶液 B、C、D 后, 用无菌蒸馏水定容至 1 L, 配置成培养体系使用的矿物营养液。

1.3 微塑料生物膜培养

枯草芽孢杆菌菌株(*Bacillus subtilis*)购于广东微生物研究所。枯草芽孢杆菌单菌落接种于含 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 振荡培养, 12 h 后取 1 mL 菌液于含 100 mL LB 培养基的 500 mL 三角瓶中培养, 使 OD_{600} 达到 0.5。取 2 mL 菌液至含有 200 mL 矿物营养液的 500 mL 三角瓶中, 将微塑料洗净灭菌后分别加入 10 g PP、10 g PE、10 g PS, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 振荡培养 3 d 形成生物膜。

1.4 生物膜和信号分子提取

将生物膜培养体系中的微塑料过滤到滤纸上, 用 0.9% 无菌氯化钠溶液缓慢冲洗微塑料, 除去其周围浮游细菌。将清洗过后的微塑料全部转移至 50 mL 的离心管中, 加入足量焦磷酸钠缓冲液($Na_4O_7P_2$ ($50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)-Tween80(0.05%))^[24], 涡旋 2 min, 重复 3 次。混合涡旋分离得到的生物膜, 在 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 10 min, 收集离心后上清液用于提取信号分子, 沉积到底部的菌体干燥后测定生物膜重量。

在收集的上清液中加入等体积的乙酸乙酯萃取, 振荡 15 min, 弃水相, 混合有机相, 重复 3 次。将上述的萃取液在 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下旋转蒸干。用无水甲醇再溶解, 定容至 2 mL。取 0.5 mL 此溶液, 加 0.5 mL 纯水, 过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜, 待测定。

1.5 仪器工作条件

采用 UPLC-MS/MS 对微塑料生物膜中 11 种 AHLs 进行定量分析。色谱柱为 ACQUITY BEH C_{18} 色谱柱($100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm} \times 1.7 \text{ } \mu\text{m}$, Waters), 流速为 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量为 $5 \text{ } \mu\text{L}$, 分析时间为 6.5 min, 柱温为 $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 流动相 A 为甲醇, B 为纯水。质谱选择电离模式为 ES+, 检测方式为多反应监测(MRM)模式, 扫描时间为 0.5 s, 离子源温度为 $150 \text{ }^\circ\text{C}$, 脱溶剂温度为 $450 \text{ }^\circ\text{C}$, 脱溶剂气和锥孔气为 N_2 , 脱溶剂气流速为 $844 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 锥孔气流速为 $154 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 碰撞气体为氩气, 毛细管电压为 1.6 kV。

1.6 色谱和质谱条件优化

将含 11 种 AHLs 和 1 种内标物的标准溶液(浓度均为 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)分别进样, 在流动相 A 甲醇中加入 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵、0.1% 甲酸对色谱条件进行优化。在 ES+模式下进行全扫描, 调整锥孔电压、碰撞电压对质谱条件进行优化。

1.7 样品前处理方法优化

对样品信号分子提取方法进行优化,用等体积的乙酸乙酯,采用振荡 15 min 和冰浴超声 15 min (200 W 功率,周期为 3 s 开、3 s 关)两种方式对微塑料生物膜中 11 种 AHLs 信号分子进行萃取;采用乙酸乙酯和酸化的乙酸乙酯(0.01% 冰乙酸, V/V)两种萃取剂对信号分子萃取剂进行优化。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 色谱和质谱条件优化

在流动相甲醇加入 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵,提高离子化效率.同时,加入 0.1% 甲酸,使峰形尖锐,提高灵敏度,降低检出限和定量限.为了更好的分离峰,采用的洗脱梯度为:流动相 A 的初始比例为 50%,在 2 min 内线性增加到 60%,0.5 min 线性增加到 80%,再用 3.5 min 增加到 100%,最后经 0.1 min 减少到 50% 并保持 0.4 min. 12 种 AHLs 信号分子(包含内标物)的峰被明显分开(图 1), 3-oxo-C12-HSL 和 3-OH-C12-HSL 异构体在电喷雾离子源正离子模式下,两个峰相交的面积减少,说明流动相优化改善检测效果.虽然内标物 C7-HSL 与被测信号分子在物理和化学性质上相似,且是被测信号分子的同系物,但是分析结果显示 C7-HSL 与被测信号分子色谱峰不重叠,适合作为目标群体感应信号分子检测分析方法的内标物。

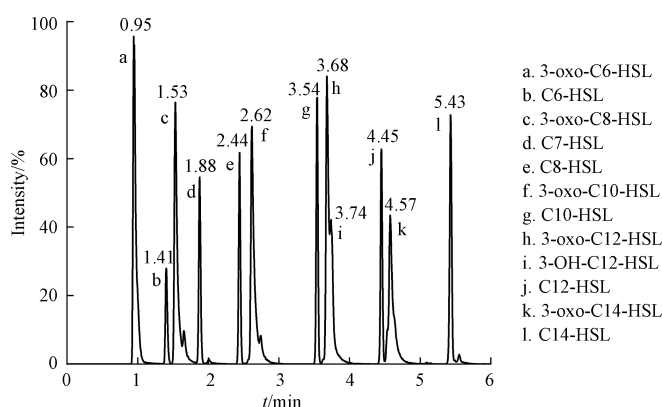


图 1 12 种 AHLs 信号分子标准品的色谱图

Fig.1 Chromatograms of 12 AHLs standards

将 11 种 AHLs 和 1 种内标物分别进样,在 ES+模式下进行全扫描,确定其母离子,优化各母离子的锥孔电压使得母离子响应强度最大;并对其子离子进行全扫描,选择其丰度最高的离子作为定量离子,丰度次之的离子作为定性离子,并对锥孔电压、碰撞电压等参数进行优化如表 1 所示。

表 1 12 种 AHLs 类信号分子的质谱条件

Table 1 Analysis parameters of 12 AHLs for mass spectrometry

化合物 Compounds	母离子(m/z) Parents ion	子离子(m/z) Daughter ion	锥孔电压/V Cone	碰撞能量/eV Collision energy
3-oxo-C6-HSL	214	102.0*,111	20	10
C6-HSL	200.1	102.0*,99	20	10
3-oxo-C8-HSL	242.2	102.0*,140.9	20	15
C7-HSL	214.3	102.0*,111.3	20	15
C8-HSL	228.2	102.0*,126.6	20	15
3-oxo-C10-HSL	270.2	102.0*,169	20	15
C10-HSL	256	102.0*,155	20	15
3-oxo-C12-HSL	298	102.0*,197	20	15
3-OH-C12-HSL	300.4	102.0*,199.4	20	15
C12-HSL	284.3	102.0*,183.1	20	15
3-oxo-C14-HSL	326.4	102.0*,102	20	15
C14-HSL	312	102.0*,211	20	15

*为定量离子. *Ions are quantitative ions.

2.2 样品前处理方法优化

用等体积的乙酸乙酯, 采用振荡和冰浴超声两种方式对微塑料生物膜中 11 种 AHLs 信号分子进行萃取. 经振荡乙酸乙酯萃取的信号分子回收率在 34.6%—107.7%, 其中对 3-oxo-C6-HSL、3-oxo-C12-HSL、3-OH-C12-HSL、3-oxo-C14-HSL 和 C14-HSL 信号分子提取的回收率均低于 50%(34.6%—48.7%) (图 2). 利用 LC-MS/MS 测定铜绿假单胞菌产生的群体感应信号分子研究也显示上述物质的回收率较低^[16]. 然而, 超声萃取对 11 种目标 AHLs 信号分子回收率在 53.6%—110%, 绝大多数高于振荡萃取方式下的回收率(图 2). 尤其与上述 5 种低回收率信号分子相比, 超声萃取能够提高其回收率达 53.7%—80%.

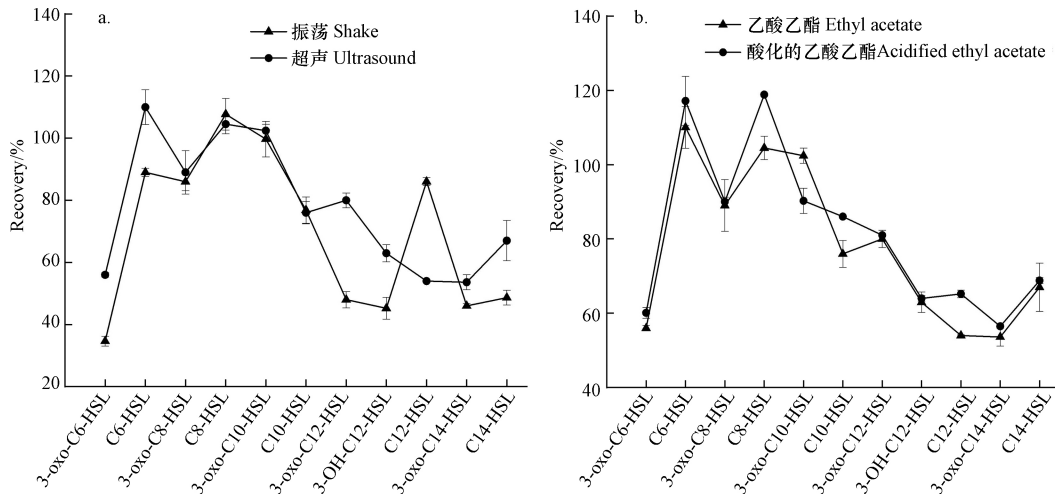


图 2 两种萃取方式(a)和两种萃取剂(b)对微塑料生物膜中 11 种 AHLs 信号分子回收率的比较 ($n = 3$)

Fig.2 Comparison of recoveries for 11 AHLs in microplastic biofilms using two extraction methods (a) and two extraction solvents (b) ($n = 3$)

对萃取剂进行优化. 采用乙酸乙酯和酸化的乙酸乙酯两种萃取剂对微塑料生物膜中 11 种 AHLs 信号分子进行萃取, 对应的回收率结果表明, 除 3-oxo-C10-HSL 外, 其余 10 种信号分子在以酸化的乙酸乙酯作为萃取剂得到的回收率相对较高(图 2). 主要由于在酸性条件能抑制乙酸乙酯水解, 提高萃取效率^[25]. 因此, 采用酸化的乙酸乙酯作为信号分子萃取剂回收率更高.

2.3 线性关系和检出限

配制 0.5、1、2、5、10、20、50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 11 种 AHLs 信号分子混合标准工作溶液, 添加内标 C7-HSL ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 以信号分子的峰面积与内标物峰面积比值为纵坐标, 以对应的浓度为横坐标做标准工作曲线. 11 种信号分子的线性回归系数 R^2 均大于 0.995(表 2), 表明目标信号分子在 0.5—50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内具有良好的线性关系. 分别以信噪比(S/N)为 3 和 10 来确定检出限和定量限, 检出限和定量限分别在 0.005—0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.01—0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围(表 2), 对目标物分析的灵敏度较高.

表 2 11 种 AHLs 信号分子的线性关系、检出限、定量限

Table 2 The linear regression equation, limit of detection, limit of quantitation of 11 AHLs

化合物 Compounds	线性回归方程 Linear regression equations	回归系数 Regression coefficient R^2	检出限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ Limit of detection	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ Limit of quantitation
3-oxo-C6-HSL	$y=3.53x+0.44$	0.9996	0.005	0.02
C6-HSL	$y=1.38x+0.09$	0.9998	0.01	0.02
3-oxo-C8-HSL	$y=5.17x+0.31$	0.9992	0.005	0.01
C8-HSL	$y=2.31x+0.57$	0.9989	0.005	0.01
3-oxo-C10-HSL	$y=2.77x+0.10$	0.9991	0.005	0.01
C10-HSL	$y=2.86x+0.80$	0.9987	0.005	0.01
3-oxo-C12-HSL	$y=6.32x+0.44$	0.9986	0.005	0.01
3-OH-C12-HSL	$y=1.38x+0.21$	0.9966	0.005	0.01
C12-HSL	$y=2.44x+0.70$	0.9971	0.005	0.01
3-oxo-C14-HSL	$y=3.70x+0.39$	0.9955	0.005	0.01
C14-HSL	$y=3.27x+0.36$	0.9987	0.005	0.02

2.4 方法的准确性和精密度

在样品中加入 11 种待测 AHLs 信号分子混合标准溶液,使加标浓度分别为 2、5、10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,同时添加内标物 C7-HSL ($10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).利用优化的分析检测方法,在 3 个加标浓度下 11 种信号分子回收率分别在 54.2%—128.1%、50.6%—109.6%、56.5%—118.8%,相对标准偏差分别为 0.2%—10.6%、0.9%—5.2%、0.3%—6.6%(表 3).可见,建立的前处理方法对微塑料生物膜中 AHLs 能实现有效提取、重现性高,可实现对实际生物膜样品 AHLs 信号分子的准确定量.

表 3 11 种 AHLs 的加标回收率和相对标准偏差($n=3$)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations of 11 AHLs($n=3$)

化合物 Compounds	添加浓度 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		添加浓度 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		添加浓度 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
	平均回收率/% Mean recovery	RSD/%	平均回收率/% Mean recovery	RSD/%	平均回收率/% Mean recovery	RSD/%
3-oxo-C6-HSL	54.2	1.3	57.2	0.9	60.1	1.5
C6-HSL	128.1	10.6	101.2	2.7	117.1	6.6
3-oxo-C8-HSL	93.0	5.5	52.6	1.6	90.0	1.2
C8-HSL	119.7	5.8	109.6	5.2	118.8	0.5
3-oxo-C10-HSL	99.5	1.6	101.3	5.2	90.2	3.4
C10-HSL	108.9	6.2	60.7	1.3	86.0	0.3
3-oxo-C12-HSL	78.0	4.3	50.6	1.6	79.0	0.4
3-OH-C12-HSL	65.1	2.3	54.2	1.4	64.0	0.8
C12-HSL	65.1	2.5	64.6	0.9	65.2	1.0
3-oxo-C14-HSL	55.3	0.2	58.4	1.6	56.5	0.5
C14-HSL	73.7	2.3	57.2	2.0	66.8	0.8

2.5 实际样品测定

采用构建的 LLE-UPLC-MS/MS 方法对微塑料上枯草芽孢杆菌生物膜分泌的 AHLs 信号分子进行定量分析. C8-HSL、C12-HSL 和 3-oxo-C10-HSL 信号分子在 3 种微塑料枯草芽孢杆菌生物膜中均被检出(图 3).然而,从不同的微塑料 PP、PE 和 PS 提取的生物膜中 AHLs 浓度具有差异,其中 PE 生物膜中提取的 3 种 AHLs 浓度均高于 PP 和 PS. 3 种微塑料生物膜中 C12-HSL 产生量最高,其在 PE 表面生物膜中含量最高达到 $34\ \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$.可见,不同的微塑料生物膜产生的信号分子量存在差异. PE 生物膜形成量高(图 3),可能是引起其信号分子分泌量高的主要因素.此外,信号分子也会影响生物膜的形成^[26].

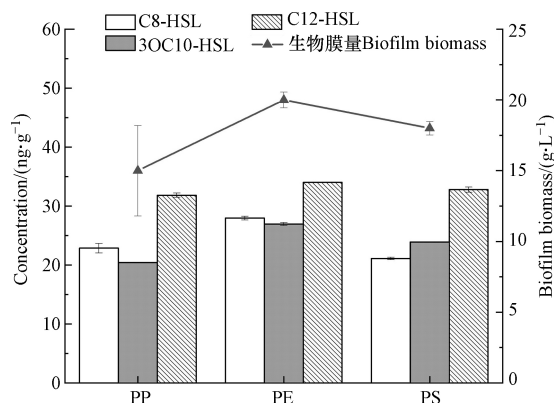


图 3 枯草芽孢杆菌生物膜群体感应信号分子

Fig.3 Quorum sensing signal molecules from *Bacillus subtilis* biofilm

AHLs 等群体感应信号分子与生物膜初始附着过程有着极强的相关性^[27],信号分子通过调节群体感应从而对微塑料生物膜的形成产生影响. Wu 等从饮用水中分离细菌菌株,研究细菌生物膜形成能力与群体感应信号分子生产能力的相关性,添加外源信号分子结果发现 1/4 的分离株的生物膜得到了显著促进^[28].因此,利用添加外源信号分子研究群体感应信号分子浓度的变化对微塑料上枯草芽孢杆

菌生物膜形成的影响. 选择检测到的 C8-HSL、C12-HSL 和 3-oxo-C10-HSL 作为外源信号分子, 分别以 0.1、1、10、100、1000、10000、10000 ng·L⁻¹ 的 7 个浓度序列添加到微塑料 PE 培养体系中, 培养 3 d 后测定细菌成膜量. C8-HSL、C12-HSL 和 3-oxo-C10-HSL 的 3 种信号分子在低浓度添加时对微塑料生物膜成膜量未产生明显的促进作用; 在添加高浓度信号分子时, 生物膜成膜量明显增加 (图 4). 可见, 外源添加的群体感应信号分子对枯草芽孢杆菌生物膜的形成会产生促进作用, 信号分子浓度越高促进作用越明显. 由此证实群体感应作为一种细胞-细胞通信机制^[29], 可通过分泌信号分子调控胞外聚合物的产生从而影响微塑料生物膜的形成^[30].

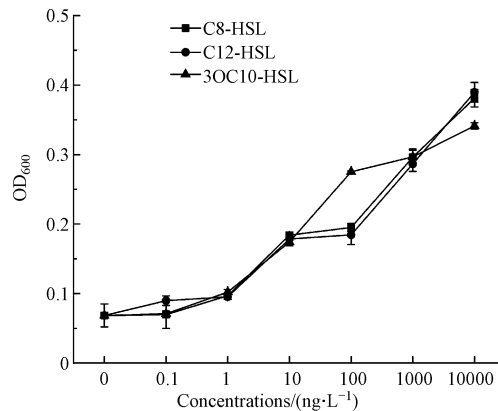


图 4 外源信号分子对枯草芽孢杆菌生物膜形成的影响

Fig.4 Effect of exogenous quorum sensing signal molecules on the biofilm formation of *Bacillus subtilis*.

3 结论(Conclusion)

本研究建立了 LLE-UPLC-MS/MS 共检测微塑料生物膜群体感应分泌的 11 种 AHLs 类信号分子的分析方法, 通过对萃取方式、萃取剂、色谱和质谱条件优化, 能够实现对信号分子快速、准确的定量分析. 利用建立的分析方法对 3 种不同的微塑料枯草芽孢杆菌生物膜群体感应 AHLs 类信号分子进行分析测定, 3 种微塑料生物膜产生的 AHLs 浓度具有差异性, 其中 PE 生物膜产生的 AHLs 浓度最高. 进一步证实信号分子分泌能够影响微塑料生物膜形成, 信号分子浓度越高对生物膜形成促进作用越明显. 可见, 群体感应作用在微塑料生物膜形成过程中具有重要作用, 且不同的微塑料生物膜群体感应对生物膜成膜的调控机制可能存在差异, 在分子水平的调控机制仍有待进一步探究.

参考文献 (References)

- [1] NIU L H, HU J X, LI Y, et al. Effects of long-term exposure to silver nanoparticles on the structure and function of microplastic biofilms in eutrophic water [J]. *Environmental Research*, 2021: 112182.
- [2] CAI L, WU D, XIA J H, et al. Influence of physicochemical surface properties on the adhesion of bacteria onto four types of plastics [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 671: 1101-1107.
- [3] TAHRIQUI A, DUCHESNE R, BOUFFARTIGUES E, et al. Extracellular DNA release, quorum sensing, and PrrF1/F2 small RNAs are key players in *Pseudomonas aeruginosa* tobramycin-enhanced biofilm formation [J]. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 2019, 5: 15.
- [4] 孙锋, 严慧聪, 汪美贞. 细菌群体感应调控多样性及群体感应淬灭 [J]. *微生物学报*, 2019, 59(3): 454-467.
SUN F, YAN H C, WANG M Z. Advance of the diversity of bacterial quorum sensing and quorum quenching [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(3): 454-467 (in Chinese).
- [5] SOLANO C, ECHEVEREZ M, LASA I. Biofilm dispersion and quorum sensing [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 18: 96-104.
- [6] ZHU L, CHEN T, XU L, et al. Effect and mechanism of quorum sensing on horizontal transfer of multidrug plasmid RP4 in BAC biofilm [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 698: 134236.
- [7] GUO X P, YANG Y, LU D P, et al. Biofilms as a sink for antibiotic resistance genes (ARGs) in the Yangtze Estuary [J]. *Water Research*, 2018, 129: 277-286.
- [8] HAMMER B K, BASSLER B L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* [J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(1): 101-104.
- [9] LIU X W, WANG H X, LI L L, et al. Do microplastic biofilms promote the evolution and co-selection of antibiotic and metal resistance

- genes and their associations with bacterial communities under antibiotic and metal pressures? [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 424: 127285.
- [10] 敬双怡, 李岩, 于玲红, 等. SMBBR工艺处理生活污水脱氮效能及其微生物多样性 [J]. *应用与环境生物学报*, 2019, 25(1): 206-214.
JING S Y, LI Y, YU L H, et al. Denitrification efficiency of the special moving-bed biofilm reactor(SMBBR) process for domestic sewage treatment and its microbial diversity [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2019, 25(1): 206-214(in Chinese).
- [11] 陈涛. 群感效应对饮用水活性炭深度处理中抗生素抗性基因水平转移的作用及调控研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2018.
CHEN T. Effects of quorum sensing on antibiotic resistome promotion in drinking water during biological activated carbon treatment[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2018(in Chinese).
- [12] 王艳, 张士春, 周进. 一种改良型检测群体感应信号分子的TLC方法 [J]. *生物学杂志*, 2020, 37(1): 97-100.
WANG Y, ZHANG S C, ZHOU J. A modified TLC method for detecting quorum sensing signal molecules of N-acyl-homoserine lactones in bacteria [J]. *Journal of Biology*, 2020, 37(1): 97-100(in Chinese).
- [13] 郭秀春, 郑立, 张魁英, 等. 气相色谱-质谱法检测细菌中N-酰基高丝氨酸内酯类信号分子 [J]. *分析测试学报*, 2012, 31(3): 347-350.
GUO X C, ZHENG L, ZHANG K Y, et al. Determination of N-acyl-homoserine lactones signal molecules by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2012, 31(3): 347-350(in Chinese).
- [14] 马晨晨, 李柏林, 欧杰, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定细菌群体感应效应的11种AHLs类信号分子 [J]. *分析化学*, 2010, 38(10): 1428-1432.
MA C C, LI B L, OU J, et al. Detection of N-acyl-homoserine lactones class signal molecules of quorum sensing secreted by bacteria using high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2010, 38(10): 1428-1432(in Chinese).
- [15] HUANG S J, ZHANG H, ALBERT NG T C, et al. Analysis of N-Acy-L-homoserine lactones (AHLs) in wastewater treatment systems using SPE-LLE with LC-MS/MS [J]. *Water Research*, 2020, 177: 115756.
- [16] LI J L, SUN K, MENG J, et al. Detection of N-acyl-homoserine lactones signal molecules of quorum sensing secreted by denitrification flora in microaerobic nitrogen removal processes by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 44(8): 1165-1170.
- [17] SUN Y P, HE K, YIN Q D, et al. Determination of quorum-sensing signal substances in water and solid phases of activated sludge systems using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2018, 69: 85-94.
- [18] WANG J F, LIU Q J, LI X H, et al. *In-situ* monitoring AHL-mediated quorum-sensing regulation of the initial phase of wastewater biofilm formation [J]. *Environment International*, 2020, 135: 105326.
- [19] JIN L, ZHANG X J, SHI H, et al. Identification of a novel N-acyl homoserine lactone synthase, AhyI, in *Aeromonas hydrophila* and structural basis for its substrate specificity [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(8): 2516-2527.
- [20] WANG J F, DING L L, LI K, et al. Estimation of spatial distribution of quorum sensing signaling in sequencing batch biofilm reactor (SBBR) biofilms [J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 612: 405-414.
- [21] 窦懿. 鲍曼不动杆菌群体感应系统信号分子N-酰基高丝氨酸内酯的鉴定以及与耐药基因相关性的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2015.
DOU Y. Study on N-acylhomoserine lactones of *Acinetobacter baumannii* quorum sensing and its relation to drug resistant gene expression[D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2015(in Chinese).
- [22] 丁雅娟, 丁蒙丹, 张佳娣, 等. 海洋微生物中的群体感应 [J]. *科技通报*, 2019, 35(6): 1-6.
DING Y J, DING M D, ZHANG J D, et al. Quorum sensing in marine microorganisms [J]. *Bulletin of Science and Technology*, 2019, 35(6): 1-6(in Chinese).
- [23] OGONOWSKI M, MOTIEI A, ININBERGS K, et al. Evidence for selective bacterial community structuring on microplastics [J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(8): 2796-2808.
- [24] LUO C H, LÜ F, SHAO L M, et al. Application of eco-compatible biochar in anaerobic digestion to relieve acid stress and promote the selective colonization of functional microbes [J]. *Water Research*, 2015, 68: 710-718.
- [25] TANG R, ZHU J L, FENG L F, et al. Characterization of LuxI/LuxR and their regulation involved in biofilm formation and stress resistance in fish spoilers *Pseudomonas fluorescens* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2019, 297: 60-71.
- [26] 朱颖楠, 王旭, 王瑾丰, 等. 外源群体感应-好氧反硝化菌强化生物膜脱氮研究 [J]. *环境科学学报*, 2019, 39(10): 3225-3237.
ZHU Y N, WANG X, WANG J F, et al. Insight into enhancing nitrogen removal in biofilm by exogenous quorum sensing-aerobic denitrifier (QS-HNAD) [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2019, 39(10): 3225-3237(in Chinese).
- [27] WANG J F, LIU Q J, WU B, et al. Quorum sensing signaling distribution during the development of full-scale municipal wastewater treatment biofilms [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 685: 28-36.
- [28] WU Z Y, WANG Q, GUO F, et al. Responses of bacterial strains isolated from drinking water environments to N-acyl-L-homoserine lactones and their analogs during biofilm formation [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2014, 8(2): 205-214.
- [29] 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.
- [30] SHIH P C, HUANG C T. Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002, 49(2): 309-314.