

鳀鱼抗菌肽脂质体的制备与抗单增李斯特菌生物被膜活性研究

蒲传奋, 唐文婷

(青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109)

摘要: 本文采用薄膜蒸发法制备得到鳀鱼抗菌肽 AAP 脂质体, 分析了脂质体的平均粒径、形态结构、包封率和贮存稳定性, 研究了其对单增李斯特菌及其生物被膜的抑制活性。结果表明制备得到的 AAP 脂质体平均粒径为 (131.65 ± 1.63) nm, 包封率为 69.75%, AAP 有效载量为 4.17%, 为内部呈环形层状分布的近球形。脂质体在 4 °C 下的贮存稳定性高于其在 25 °C 下的稳定性。脂质体型 AAP 和未包封 AAP 均能抑制单增李斯特菌的生长, 但因脂质体的控释作用, 两者对指示菌生长曲线的改变历程略有差异。脂质体型 AAP 抗单增李斯特菌生物被膜活性高于未包封 AAP。结晶紫染色和银染实验结果表明 AAP 脂质体能抑制单增李斯特菌生物被膜的形成。扫描电镜和激光共聚焦显微镜形态观察表明 AAP 脂质体可引起细菌细胞结构的明显坍塌、细胞膜破损和胞内物质外溢, 从而抑制生物被膜的形成。

关键词: 抗菌肽; 脂质体; 单增李斯特菌; 生物被膜

文章编号: 1673-9078(2017)1-54-61

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.1.009

Anchovy Antibacterial Peptide Liposome Preparation and Antibiofilm Activity against *Listeria monocytogenes*

PU Chuan-fen, TANG Wen-ting

(Food Science & Engineering College, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: Anchovy antibacterial peptide (AAP) liposomes were prepared via thin film evaporation technique in this work. The average particle diameter, morphological structure, encapsulation efficiency, and stability of the prepared liposomes were analyzed, and the antibacterial and antibiofilm activities against *Listeria monocytogenes* were also evaluated. The results showed that the average particle size of AAP liposomes was 131.65 ± 1.63 nm, the encapsulation efficiency was 69.75%, and the effective load of AAP was 4.17%. The liposomes were nearly spherical with an annular lamellar distribution. The storage stability of the liposomes under 4 °C was higher than that of those under 25 °C. AAP and its liposomes could inhibit the growth of *L. monocytogenes*, but free AAP and AAP liposomes affected the growth curves in a slightly different way, because of the controlled release effect of the liposome. The antibiofilm activity of the liposomes was higher than that of free AAP. Crystal violet and silver staining experiments showed that the AAP lipid could inhibit *L. monocytogenes* biofilm formation. Scanning electron microscope and confocal laser scanning microscopy showed that AAP liposomes could cause the collapse of bacterial cell structure, and result in cell membrane damage and expulsion of intracellular material, further inhibiting biofilm formation.

Key words: antibacterial peptide; liposome; *Listeria monocytogenes*; biofilm

单核细胞增生李斯特菌是世界卫生组织定义的四大大食源性致病菌之一。该菌能通过污染的食物进入人畜体内, 引发败血症、脑膜炎、流产和单核细胞增多等症, 致死率达 20~30%^[1]。单增李斯特菌可黏附在

收稿日期: 2016-01-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31501578); 山东省中青年科学家科研奖励基金资助项目 (BS2015SW019); 青岛农业大学高层次人才科研基金资助项目 (6631115030)

作者简介: 蒲传奋 (1980-), 男, 讲师, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 唐文婷 (1981-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术

食品或食品加工设备表面, 形成生物被膜。生物被膜是与浮游细胞相对应的一种微生物细胞在生物或非生物表面的生长方式, 是细胞分泌的多糖、纤维蛋白和脂质蛋白等具有保护性和吸附性的多聚基质将其自身包裹而形成的结构性微生物群落。已形成的生物被膜还是其它多种致病菌及腐败微生物的藏身之处, 增加食品本身和加工环境的污染或再污染风险。被膜态与浮游态单增李斯特菌在细胞结构和生物学特性上的差异, 导致前者比后者抗性更强、危害更严重且更难清除^[2]。

国内外学者在单增李斯特菌及其生物被膜的控制方法上进行了相关探索。李燕杰等采用超声波清除单增李斯特菌生物被膜^[3]。蒲月华发现纳豆菌抗菌肽AMPNT-6能减少单增李斯特菌生物被膜的形成^[4]。Ayebah等发现电解质水可以使减少浮游态和被膜态单增李斯特菌4~5个对数单位^[5]。Oliveira等发现柠檬草和香茅复方精油能抑制其生物被膜的生成^[6]。然而,这些方法主要采用化学消毒剂、天然精油、抗菌肽和物理方法。这些方法能否应用于食品领域需要考虑其安全性、有效性和经济性。致病菌易对化学消毒剂产生耐药性,且化学品的潜在毒性及其残留会降低食品安全性。精油类较强的天然风味可能会干扰食品本身的感官性状,且其疏水特性会阻碍其从生物被膜表面向内部的扩散。一些物理手段如超声波、高压脉冲电场等,成本较高且有一定的局限性。因此,有必要开发新型、安全和高效的控制/清除单增李斯特菌及其生物被膜的方法。

抗菌肽是一类具有广谱抗菌活性的小分子短肽,其具有不同于传统抗生素的杀菌机制,不易产生病原菌耐药性和交叉抗性。少部分抗菌肽已被证实具有抑制单增李斯特菌及其生物被膜的作用^[7]。鳀鱼抗菌肽(anchovy antimicrobial peptide, AAP)属阳离子型抗菌肽,其氨基酸序列为GLSRLFTALK,该肽能作用于细菌细胞膜,破坏其完整性而导致胞内物质溢出胞外而死亡^[8]。本文采用薄膜分散法制备AAP脂质体,分析制备条件对脂质体粒径及包封率的影响,并考察了最终制备的脂质体在不同温度下的贮存稳定性。以未包封AAP未对照,研究了AAP脂质体对单增李斯特菌生长曲线的影响,并从干扰生物被膜形成和清除已形成生物被膜角度,分析了其抗单增李斯特菌生物被膜活性。通过结晶紫染色、银染结合光学显微镜以及扫描电子显微镜、激光共聚焦显微镜观察AAP脂质体作用前后单增李斯特菌生物被膜的形态结构变化。研究结果为开发消除食源性致病菌生物被膜的新型手段提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

卵磷脂(粉末)和胆固醇,生工生物工程(上海)股份有限公司;鳀鱼抗菌肽(GL),上海吉尔生化有限公司;单增李斯特菌(ATCC19114)和TSB培养基,青岛海博生物技术有限公司;TritonX-100, Sigma。LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit,美国Molecular Probes公司。其它所用化学试剂均为分析

纯。

1.2 仪器设备

YXQ-LS-50SII全自动立式电热压力蒸汽灭菌锅,上海博讯实业有限公司;BSC-1500IIA2-X生物安全柜,山东博科生物产业有限公司;Free Zone 2.5冷冻干燥机,美国Labconco;JEOL 7500F扫描电子显微镜,日本JEOL公司;HT 7700透射电子显微镜,日本Hitachi公司;BX41光学显微镜, TCS SP5激光共聚焦显微镜,德国徕卡公司。

1.3 实验方法

1.3.1 脂质体的制备

采用薄膜分散法制备,按胆固醇与磷脂质量比为1:7的比称取卵磷脂、胆固醇置于圆底烧瓶中,加入20 mL氯仿溶解,之后采用40 °C水浴旋转蒸发除去有机溶剂,使混合脂质在圆底烧瓶内壁形成均匀薄膜。将AAP(AAP与磷脂质量比为1:3)溶入PBS(0.05 M, pH为7.2)缓冲液(磷脂与PBS质量/体积比为7.5 mg/mL)中,加入圆底烧瓶中,水化一定时间后,350 W条件下水浴探头超声5 min,即得AAP脂质体混悬液。混悬液于-18 °C冰箱冷冻24 h,之后室温下解冻,反复冻融3次,冷冻干燥后得AAP脂质体冻干粉。

1.3.2 脂质体的性质表征

1.3.2.1 脂质体粒径的测定

脂质体的平均粒径及其分布采用动态光散射(dynamic light scattering, DLS)测定,脂质体混悬液经PBS缓冲液稀释适当后,移入比色皿中,25 °C保温2 min,测定平均粒径及多分散指数PDI。

1.3.2.2 脂质体形态观察

将AAP脂质体经PBS缓冲液适当稀释后,吸取少量滴加至铜网正面,用滤纸吸去多余样品,经2%磷钨酸钠溶液负染3 min后自然晾干,采用透射电子显微镜下观察其形态结构。

1.3.2.3 包埋率及有效载量的测定

1 mL样品加入1 mL去离子水,4 °C离心法(8000 r/min, 20 min)分离脂质体和未包埋的肽。分离上清液,沉淀采用去离子水洗涤2次,收集所有上清液,稀释至10 mL,以备测定未包埋肽的量。沉淀分散于去离子水中,定容至5 mL。2 mL分散液加入2 mL、2% TritonX-100,以破坏脂质体并释放出抗菌肽。抗菌肽的定量采用HPLC法,色谱条件为:分析柱, Waters symmetry C18柱, 250×4.6 mm;柱温, 25 °C;进样量, 10 μL;流动相流速, 0.5 mL/min;流动相, 溶剂A, 含0.1% (V/V) TFA的水溶液, 溶剂B, 100%

乙腈;洗脱程序,线性梯度洗脱(0~26 min, 10%~80%溶剂B);检测器波长,215 nm。精确称取 AAP 5.0 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加 10%乙腈溶解并稀释至刻度,得 100 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液。精密移取对照品溶液适量,稀释成 5、10、20、25 和 50 $\mu\text{g/mL}$ 系列浓度的标准溶液,按上述色谱条件进行 HPLC 分析,以峰面积对肽质量做标准曲线。

包埋率(Encaosulation efficiency, EE %)和有效载量分别按下式计算:

$$\text{EE}(\%) = \frac{\text{包埋的抗菌肽质量}}{\text{未包埋的抗菌肽质量} + \text{包埋的抗菌肽质量}} \times 100\%$$

$$\text{有效载量}(\%) = \frac{\text{被包埋的 AAP 质量}}{\text{脂质质量}} \times 100\%$$

1.3.3 AAP 脂质体贮存稳定性研究

分别在 4 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 下,将冻干 CA 脂质体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 90 d,于 0、30、60 和 90 d 分析脂质体的粒径、多分散指数和渗透率。渗透率的计算公式为:

$$\text{渗透率} = \frac{\text{贮存前包封 AAP 量} - \text{贮存后包封 AAP 量}}{\text{贮存前包封药量}} \times 100\%$$

1.3.4 抗菌活性的测定

1.3.4.1 最小抑菌浓度 MIC 的测定

将 APP 溶液经灭菌 PBS 缓冲液倍比稀释。单增李斯特菌菌液接种于无菌 TSB 培养液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,所得菌体重悬至 OD_{600} 在 0.1~0.3 之间。依次将 100 μL TSB 培养基、100 μL 受试菌液和 50 μL 不同浓度的 AAP 溶液加入到灭菌平底 96 孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h。酶标仪于 630 nm 处测定每孔吸光值。对照组采用 PBS 代替 APP 溶液。与初始值相比, OD_{630} 不再增加的肽的最小浓度为 AAP 的最小抑菌浓度(MIC)。

1.3.4.2 对生长曲线影响的测定

单增李斯特菌菌液接种于无菌 TSB 培养液中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,采用 PBS 缓冲液洗涤 3 遍后重悬为至 OD_{630} 为 0.083。在菌悬液中加入 APP 及其脂质体(AAP 有效终浓度为 0.5 MIC、1 MIC)。细菌生长对照组加入等体积的 PBS 缓冲液。混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,每隔 0.5 h 测定其 OD_{630} 值。实验设置 3 个重复,结果取平均值。

1.3.4.3 抑菌圈实验

将 1.3.4.2 中制成的菌悬液均匀涂布至营养琼脂培养基上。将直径 6 mm 的灭菌滤纸片分别浸泡于 1 MIC 的 AAP 及其脂质体溶液中,取出置于涂菌平板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱倒置培养 18 h,已灭菌生理盐水为对照。

1.3.5 抗生物被膜活性

1.3.5.1 对单增李斯特菌生物被膜形成的抑制

向灭菌平底 96 孔板每孔依次加入 100 μL TSB 培

养基、100 μL 菌悬液和不同浓度的 AAP 或其脂质体混悬液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养,分别培养 1、2、4、6、8、10、12 和 14 h 后,弃去板中培养液。灭菌 PBS 缓冲液清洗 3 次,30 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 30 min。采用 0.2%结晶紫 200 μL 染色 45 min,30 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 30 min 干燥后加入 200 μL 95%的乙醇,酶标仪于 595 nm 处测其吸光度值,实验平行 3 次。

1.3.5.2 对单增李斯特菌生物被膜的清除

向灭菌平底 96 孔板每孔依次加入 100 μL TSB 培养基、100 μL 菌悬液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h。弃去培养液,灭菌 PBS 缓冲液清洗 3 次,每孔加入 200 μL 不同浓度的 AAP 或其脂质体混悬液。作用 1、2、4、6、8、10、12 和 14 h 后,弃去抗菌肽脂质体。灭菌 PBS 缓冲液清洗 3 次,55 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min。采用 0.2%结晶紫 200 μL 染色 45 min,干燥后加入 200 μL 95%的乙醇,酶标仪于 595 nm 处测其吸光度值,实验平行 3 次。

1.3.5.3 银染法表征 AAP 脂质体的抗单增李斯特菌生物被膜作用

向直径 9 cm 的灭菌培养皿中注入 15 mL TSB 培养基、1 mL 菌悬液和 4 mL 抗菌肽脂质体溶液(终浓度为 1 MIC),并放入无菌盖玻片,培养 72 h。参考文献方法^[9],培养结束后取出盖玻片,经灭菌生理盐水多次充分漂洗,去掉浮游菌,并采用 2.5%戊二醛溶液固定 1 h,灭菌生理盐水清洗后,采用饱和氯化钙溶液结合 15 min,再经灭菌生理盐水清洗,5%硝酸银溶液反应 15 min,之后采用 1%对苯二酚溶液显色 2 min,漂洗后经 5%硫代硫酸钠溶液固定 2 min,漂洗后采用普通光学显微镜观察。以 4 mL 灭菌生理盐水代替 4 mL 抗菌肽脂质体溶液作为对照。

1.3.5.4 结晶紫法表征 AAP 脂质体的抗单增李斯特菌生物被膜作用

采用 1.3.5.3 的方法在盖玻片上培养单增李斯特菌生物被膜。培养 72 h 后取出盖玻片,经灭菌生理盐水多次充分漂洗,去掉浮游菌,加入甲醇固定 15 min,清洗后室温下自然晾干,之后采用 2%结晶紫染色 15 min,清洗后室温下自然晾干,再加入 33%冰醋酸脱色,自然晾干后光学显微镜下观察单增李斯特菌生物被膜的形态。以 4 mL 灭菌生理盐水代替 4 mL 抗菌肽脂质体溶液作为对照。

1.3.5.5 扫描电镜表征 AAP 脂质体的抗单增李斯特菌生物被膜作用

采用 1.3.5.3 的方法在盖玻片上培养单增李斯特菌生物被膜。培养 72 h 后取出盖玻片,洗去浮游菌,经 2.5%戊二醛 PBS 溶液固定过夜后,采用灭菌 PBS 溶液冲洗 3

遍,再经30%、50%、70%、80%、90%和95%浓度的乙醇梯度脱水各15 min,100%乙醇脱水两次,每次30 min,经醋酸异戊酯置换,临界点干燥仪干燥后喷金,扫描电子显微镜观察生物被膜微观形态结构。以4 mL灭菌生理盐水代替4 mL抗菌肽脂质体溶液作为对照。

1.3.5.6 激光共聚焦显微镜表征 AAP 脂质体的抗单增李斯特菌生物被膜作用

采用 1.3.5.3 的方法在盖玻片上培养单增李斯特菌生物被膜。培养 72 h 后取出盖玻片,用灭菌生理盐水漂洗。参照 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit 说明书,配制荧光染料 PI 和 SYTO 9 溶液,并对样品进行染色,室温避光孵育 15 min,弃去染液,盖玻片用灭菌生理盐水洗涤,将盖玻片避光置于吸水纸上晾干,采用激光共聚焦显微镜采集图像^[10]。以 4 mL 灭菌生理盐水代替 4 mL 抗菌肽脂质体溶液作为对照。

1.4 数据处理

采用 Origin 8.0 和 SPSS 17.0 对实验数据进行分析。所有实验平行 3 次,结果以其平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 AAP 脂质体粒径及结构

采用薄膜分散法制备所得 AAP 脂质体,冻干复溶后稀释,经激光散射粒度分析仪测定脂质体粒径及分布(图 1)。结果表明,空白脂质体和 AAP 脂质体粒度分布较均匀,平均粒径分别为(115.6±3.32) nm 和 (131.65±1.63) nm,多分散性指数 PDI 分别为 0.434 和 0.367。该结果说明 AAP 的载入增大了脂质体的粒径。PDI 反映脂质体粒径的分布情况^[11],结果暗示着脂质体的粒径分布较集中,AAP 的载入并未影响体系的均

一性。此条件下,制得的 AAP 脂质体的包封率为 69.75%,AAP 有效载量为 4.17%。

AAP 脂质体混悬液适当稀释后,经 2% 磷钨酸负染,于透射电镜下观察形态,结果见图 2。图中表明 AAP 脂质体外观光滑及圆整,为近球形结构,呈环形层状分布,可见脂质体内部空心。

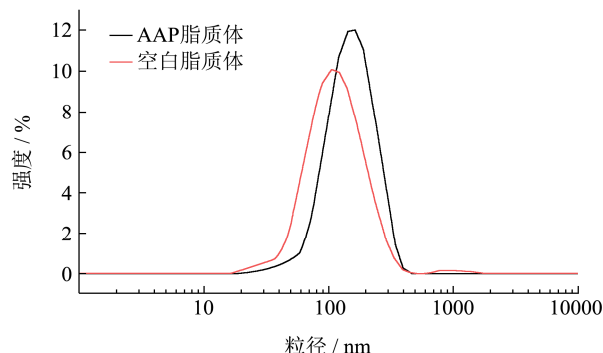


图 1 空白脂质体及 AAP 脂质体粒径分布图

Fig.1 Particle size distributions of blank liposomes and AAP liposomes

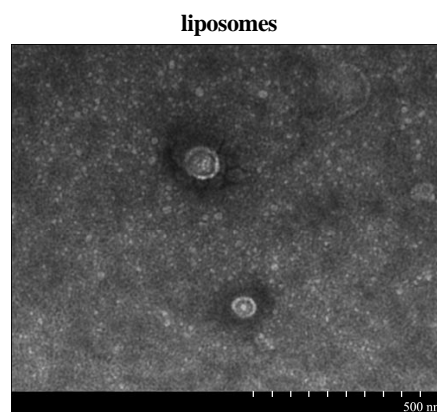


图 2 AAP 脂质体透射电子显微镜照片

Fig.2 Transmission electron microscopic photograph of AAP liposomes

2.2 AAP 脂质体贮存稳定性

表 1 AAP 脂质体贮存稳定性指标变化

Table 1 Changes in liposome storage stability indices

时间/d	粒径/nm		PDI		泄漏率/%	
	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C	4 °C	25 °C
0	135.16±2.34	132.58±1.39	0.39±0.02	0.32±0.02	0	0
30	139.76±3.17	178.29±2.08	0.41±0.03	0.47±0.03	0.28±0.01	0.69±0.05
60	161.09±5.78	230.57±3.37	0.50±0.04	0.61±0.02	2.63±0.02	6.87±0.01
90	195.73±5.60	261.28±2.75	0.68±0.03	0.96±0.03	5.12±0.05	11.08±0.07

脂质体在贮存过程中易发生聚集、沉淀和分解等失稳性变化,从而导致被包埋物的泄漏^[12]。将脂质体粉末置于 4 °C 和 25 °C 条件下贮存不同时间,测定其粒径、PDI 和泄漏率。由表 1 可见,相同贮存时间下,

AAP 脂质体在 4 °C 的粒径、PDI 和泄露率的变化率低于其在 25 °C 条件下的变化率;相同贮存温度下,三个指标均随贮存时间的延长而增大,AAP 脂质体于 4 °C 和 25 °C 条件贮存 90 d 后平均粒径增长了 44.81%和

97.07%, PDI 分别由(0.39±0.02)和(0.32±0.02)增长至(0.68±0.03)和(0.96±0.03)。结果表明 AAP 脂质体在 4 °C 条件下的贮存稳定性优于其在 25 °C 条件下的相应指标。

2.3 AAP 脂质体抗单增李斯特菌活性的测定

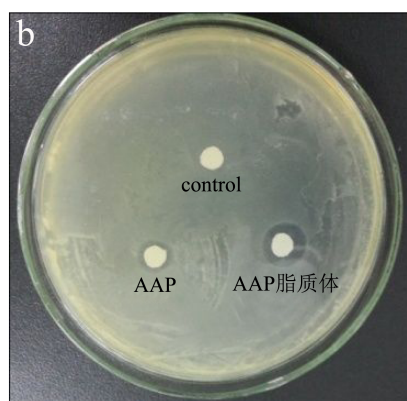
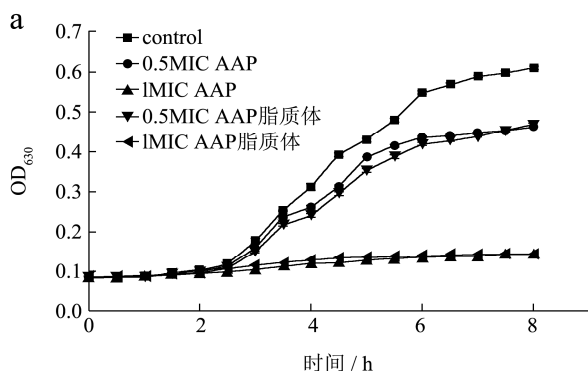


图3 AAP 及其 AAP 脂质体(1MIC)对单增李斯特菌的抑制作用

Fig.3 Anti-*L. monocytogenes* effect of AAP and AAP liposomes (1 MIC)

注: a, 生长曲线; b, 抑菌圈。

实验测定 AAP 对单增李斯特菌的 MIC 为 128 μg/mL。不同浓度的 AAP 及其脂质体对其生长曲线的影响如图 3a 所示, 其中 AAP 脂质体的浓度按其有效载量进行折算。指示菌于 37 °C 孵育, 菌液吸光值在 2.5 h 后迅速增大, 至 8 h 后达 (0.609±0.002)。加入不同浓度的 AAP 及其脂质体后, 菌液吸光值及其增加速度均减小, 且这种作用效果均呈浓度依赖性关系。相同有效 AAP 浓度条件下, 抗菌剂作用 3 h 即表现出明显的抑制作用。加入 0.5 MIC 的 AAP 脂质体孵育 8 h 后的菌液吸光值为对照的 76.19%; 而加入 1 MIC 以上浓度的 AAP 脂质体孵育 8 h 后的菌液吸光值均在 0.145 以下。结果说明 AAP 及其脂质体对单增李斯特的生长均有抑制作用; 在 0~7 h 时间范围内, 相同有效作用浓度下, 脂质体型 AAP 的抑制作用稍滞后于游离型 AAP, 这可能与脂质体的控释作用和细胞融合特性有关, AAP 需要一定的时间从脂质体囊泡中释放

出来之后才可与指示菌发生作用。图 3b 通过抑菌圈实验反映了浓度为 1MIC 的 AAP 及其脂质体对单增李斯特菌的抑制作用, 图中可见, 对照纸片周围无透明圈出现, AAP 纸片周围出现直径为 8.9 mm 的透明圈, AAP 脂质体纸片周围出现 12.2 mm 的透明圈, 结果表明灭菌生理盐水无抑菌作用, AAP 脂质体对单增李斯特菌的抑制作用要强于 AAP, 该结果与生长曲线的测定结果相一致。

2.4 AAP 脂质体的抗单增李斯特菌生物被膜形成活性

形成活性

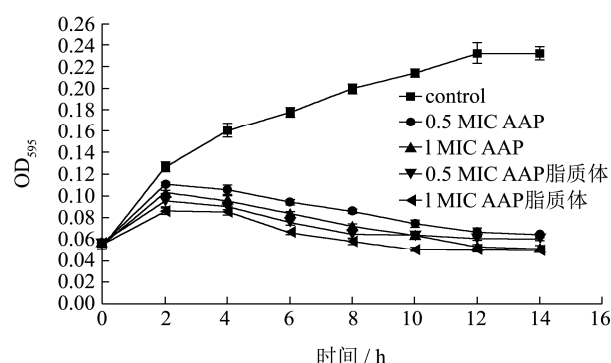


图4 AAP 及其脂质体的抗单增李斯特菌生物被膜形成作用

Fig.4 Anti-*L. monocytogenes* biofilm effects of AAP and AAP liposomes

不同浓度的 AAP 及其脂质体对单增李斯特菌生物被膜形成的影响, 结果见图 4。由图可见, 对照组中 0~12 h OD₅₉₅ 值逐渐增加, 生物被膜处于形成阶段, 12 h 后处于稳定状态。在相同的孵育时间, AAP 及其脂质体处理组的 OD₅₉₅ 值要显著低于对照 ($p < 0.05$); 同一有效浓度的脂质体型 AAP 抑制被膜形成效果优于游离型 AAP; 两者的作用浓度越大, 生物被膜生成量越小。

2.5 AAP 脂质体的清除单增李斯特菌生物被膜活性

不同浓度的 AAP 及其脂质体对经 72 h 培养的单增李斯特菌生物被膜的清除效果如图 5 所示。由图可见, 不同浓度的 AAP 及其脂质体对已形成生物被膜有显著清除作用, 随着浓度的增加, 处理时间的延长, 样品 OD₅₉₅ 值显著低于对照组 ($p < 0.05$)。相同作用时间下, 相同有效浓度的脂质体型 AAP 比游离型 AAP 处理的样品的 OD₅₉₅ 值低。生物被膜是由细菌分泌的多糖、蛋白等物质形成的网络结构, 脂质体能够定向吸附于生物被膜表面, 实现了 AAP 的靶向传输, 因

此提高了其抗生物被膜的有效性^[13]。

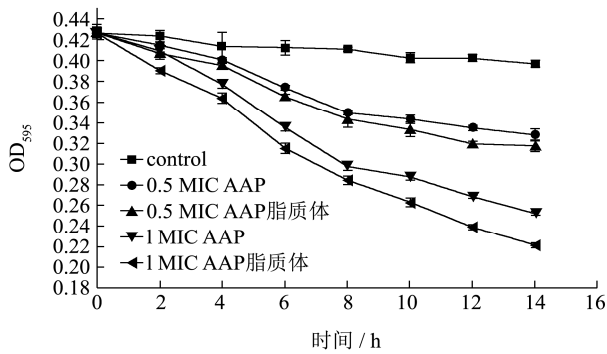


图5 AAP 及其脂质体清除单增李斯特菌生物被膜活性

Fig.5 *L. monocytogenes* biofilm-clearing effects of AAP and AAP liposomes

2.6 银染法表征 AAP 脂质体对单增李斯特菌生物被膜的清除

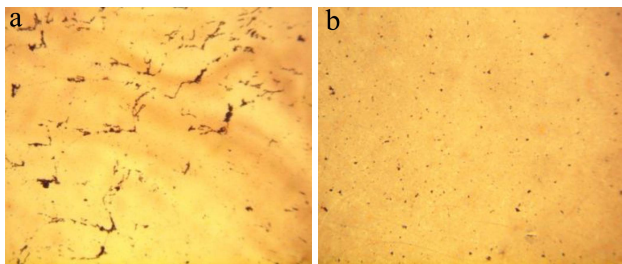


图6 AAP 脂质体处理前(a)后(b)单增李斯特菌生物被膜的银染显微镜图(×100)

Fig.6 Microscopic images of silver-stained *L. monocytogenes* biofilm before (a) and after (b) AAP liposome treatment (×100)

银染法是一种可以定性鉴定和检测细菌生物被膜的方法，操作简单且对设备要求不高。文中采用银染法直观反映AAP脂质体对单增李斯特菌生物被膜的抑制作用。图6a为TSB培养基中培养48 h后的对照盖玻片银染后光学显微镜照片，图中黑染部分且呈絮状的膜样物为生物被膜，表明生物被膜已明显形成。图6b为添加1 MIC的抗菌肽脂质体的样品培养48 h后的照片，与对照相比，视野中仅显示有少量散落的黑点或黑斑，并无黑染的絮状膜样物，表明抗菌肽脂质体具有较好的抗单增李斯特菌生物被膜作用。

2.7 结晶紫法表征 AAP 脂质体对单增李斯特菌生物被膜的清除

结晶紫染色也是一种常用的鉴定细菌生物被膜的方法，通过染色后样品颜色的深浅，可以测定生物被膜的总量。图7为采用结晶紫染色、普光学显微镜观

察到的单增李斯特菌生物被膜，其中 a 为培养 72 h 后的样品照片，图中可见载体上附着大量菌体，局部菌体较为密集且菌体相连呈现出紫色网状结构；b 为添加 AAP 脂质体培养后观察到的显微镜照片，仅有少量菌体可附着于载体表面，已无明显紫色的染色物。实验结果表明 AAP 抗菌肽脂质体能够抑制单增李斯特菌在载体表面形成生物被膜。

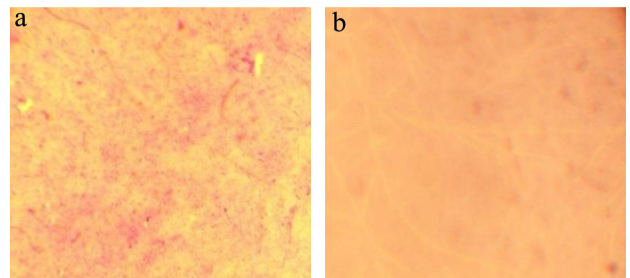


图7 AAP 脂质体处理前(a)后(b)单增李斯特菌生物被膜的结晶紫染色显微镜图(×100)

Fig.7 Microscopic images of *L. monocytogenes* biofilm via crystal violet staining before (a) and after (b) AAP liposome treatment (×100)

2.8 扫描电子显微镜表征 AAP 脂质体对单增李斯特菌生物被膜的清除

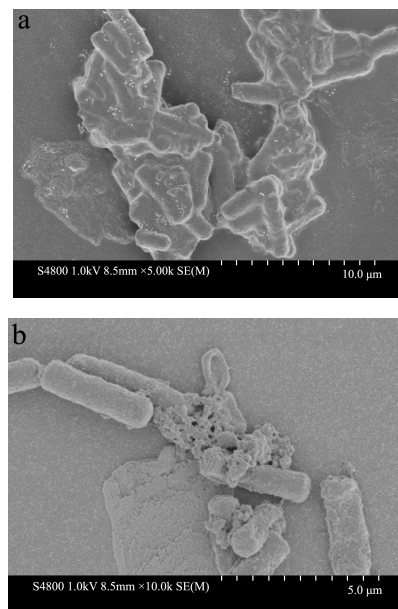


图8 AAP 脂质体处理前(a)后(b)单增李斯特菌生物被膜的扫描电子显微镜图

Fig.8 Scanning electronic microscopic images of *L. monocytogenes* biofilm before (a) and after (b) AAP liposome treatment

扫描电子显微镜电镜具有比普通显微镜更高的放大倍数，能更为清晰的观察到生物被膜的微观形态结

构。生物被膜在形成过程中,菌体本身不断分泌多糖基质、纤维蛋白和脂质蛋白等,并将其自身包绕其中而形成细菌聚集膜样物^[14]。从图8可见,培养72 h的单增李斯特菌已完全被自身所分泌的膜样物质包裹,但仍可见杆状的菌体轮廓。而经1 MIC的AAP脂质体作用后的载体表面生物量减少,已无生物被膜包裹的菌体聚集物,残存的部分菌体可见明显坍塌、胞内物质外溢等形变,表明AAP脂质体具有较好的抑制单增李斯特菌在介质表面形成生物被膜的能力,并可破坏菌体细胞膜。*L. monocytogenes*可黏附在常见食品接触材料表面形成生物被膜;已形成的生物被膜还是其它多种致病菌及腐败微生物的藏身之处,菌落间的互感效应引发各微生物的协同共生,增加食品本身和加工环境的污染或再污染风险,给食品安全带来极大危害。扫描电镜实验结果表明AAP脂质体可用于控制/清除单增李斯特菌生物被膜。

2.9 激光共聚焦显微镜表征 AAP 脂质体对单增李斯特菌生物被膜的清除

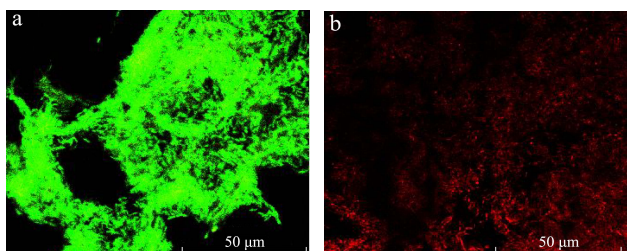


图9 AAP脂质体处理前(a)后(b)单增李斯特菌生物被膜的激光共聚焦显微镜

Fig.9 Confocal laser scanning microscopic images of *L. monocytogenes* biofilm before (a) and after (b) AAP liposome treatment

为进一步深入研究AAP脂质体对单增李斯特菌生物被膜内菌体存在状态的影响,采用PI、SYTO 9荧光双标记法结合激光共聚焦显微镜(Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM)技术分析其作用前后被膜的变化。PI和SYTO 9是两种具有不同光谱特征和细胞渗透性的核酸染料。SYTO 9能渗透进入膜完整和膜受损的细胞膜并与DNA结合,在激发波长490 nm和发射波长635 nm附近发出绿色荧光;而PI仅能进入破损细胞膜且会竞争SYTO 9的结合位点,在激发波长480 nm和发射波长500 nm附近发出红色荧光。LIVE/DEAD Baclight染色技术即是基于荧光染料与DNA结合,使活/死菌在488 nm激发波长下分别发射绿/红色荧光的原理,实现监测样品中活/死菌水平的试验目的,也即在488 nm激发波长下,完整的细菌细胞

膜将发出绿色荧光,而被破坏的细胞膜发红色荧光,由图9可见,单增李斯特菌培养72 h的生物被膜为大片绿色隆起,发射出的绿色荧光表明被膜内细菌为存活状态,细胞膜完整,PI不能进入。视野中所见的细胞团,主要是由于生物被膜形成过程中细菌菌体的富集和堆叠所造成的,细胞粘附在介质表面之后不断增殖,并富集环境中的游离菌体,共同被胞外基质所包裹,形成细胞团。AAP脂质体作用后的样品则呈现红色,表明此时细菌细胞膜破损,分子探针PI进入胞内与SYTO 9竞争并最终取代DNA结合位点,细菌为死菌;且样品厚度减少,表明生物量减少明显。由图可知,AAP脂质体可能是通过破坏细菌细胞膜来抑制单增李斯特菌生物被膜的形成,该结果与扫描电镜的结果相一致。

3 结论

采用薄膜分散法制备制得鳀鱼抗菌肽AAP脂质体,其包封率为69.75%,AAP有效载量为4.17%,平均粒径为(131.65±1.63) nm,多分散性指数PDI为0.367。AAP脂质体外观光滑、圆整,为近球形结构,内部呈环形层状分布。AAP脂质体在4℃条件下贮存90 d的粒径、PDI和泄露率的变化率低于其在25℃条件下的变化率。相同有效浓度的脂质体型AAP对单增李斯特菌的抑制作用稍滞后于未包封AAP。脂质体型AAP干扰单增李斯特菌生物被膜形成及清除72 h单增李斯特菌生物被膜的有效性高于未包封AAP。结晶紫染色和银染实验结果表明AAP脂质体能有效抑制单增李斯特菌生物被膜的形成。扫描电镜和激光共聚焦显微镜形态观察表明AAP脂质体能引起细菌细胞结构的明显坍塌、细胞膜破损及胞内物质外溢,从而抑制生物被膜的形成。以上实验结果表明,AAP脂质体可用作食源性致病菌生物被膜的新型抑制剂。

参考文献

- [1] Carpentier B, Cerf O. Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 145(1): 1-8
- [2] Leong D, Alvarez-Ordóñez A, Jordan K. Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the republic of Ireland [J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 436-436
- [3] 李燕杰,朱小花,杨公明.超声波处理对单核细胞增生性李斯特菌生物被膜的清除效果研究[J].食品工业科技,2015, 36(3):293-296

- LI Yan-jie, ZHU Xiao-hua, YANG Gong-ming. Study on the removal effect of ultrasonic treatment on biofilm of *Listeria monocytogene* [J]. Food Industry Science and Technology, 2015, 36(3): 293-296
- [4] 蒲月华.纳豆菌抗菌肽对对虾中金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的控制效应及数学模型建立[D].湛江:广东海洋大学,2013
- PU Yue-hua. Inhibitory activity of a novel antimicrobial peptide AMPNT-6 from *Bacillusnatto* against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* and development of its antibiotic mathematical model in shrimp [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2013
- [5] Ayebeh B, Hung Y C, Kim C, et al. Efficacy of electrolyzed water in the inactivation of planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* in the presence of organic matter [J]. Journal of Food Protection, 2006, 69(9): 2143-2150
- [6] Oliveira M M M, Brugnera D F, Cardoso M G, et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface [J]. Food Control, 2010, 21(4): 549-553
- [7] de la Fuente-Núñez C, Korolik V, Bains M, et al. Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012, 56(5): 2696-2704
- [8] Tang W, Hui Z, Li W, et al. Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis [J]. Food Chemistry, 2015, 168: 115-123
- [9] Königs A M, Flemming H C, Wingender J. Nanosilver induces a non-culturable but metabolically active state in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 395
- [10] Fan M, Xu S, Xia S, et al. Effect of different preparation methods on physicochemical properties of solidoside liposomes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(8): 3089-3095
- [11] Chu B, Wang Z, Yu J. Dynamic light scattering study of internal motions of polymer coils in dilute solution [J]. Macromolecules, 1991, 24(26): 6832-6838
- [12] Pentak D. Physicochemical properties of liposomes as potential anticancer drugs carriers. interaction of etoposide and cytarabine with the membrane: spectroscopic studies [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014, 122: 451-460
- [13] Cheow W S, Hadinoto K. Lipid-polymer hybrid nanoparticles with rhamnolipid-triggered release capabilities as anti-biofilm drug delivery vehicles [J]. Particuology, 2012, 10(3): 327-333
- [14] McDougald D, Rice S A, Barraud N, et al. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal [J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(1): 39-50

(上接第 53 页)

- [12] Romero A, Bengoechea C, Cordobés F, et al. Application of thermal treatments to enhance gel strength and stability of highly concentrated crayfish-based emulsions [J]. Food Hydrocolloids, 2009, 23(8): 2346-2353
- [13] 何志平.浙江山核桃抗氧化与蛋白质特性研究[D].杭州:浙江大学,2011
- HE Zhi-ping. Study on the functional properties of protein and antioxidant properties of Chinese Hickory (*Carya athayensis* Sarg.) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011
- [14] Arogundade L A, Mu T H, Añón M C. Heat-induced gelation properties of isoelectric and ultrafiltered sweet potato protein isolate and their gel microstructure [J]. Food Research International, 2012, 49(1): 216-225