

纳豆菌抗菌脂肽对副溶血弧菌的抑菌机理

刘唤明¹, 孙力军^{1,*}, 王雅玲¹, 徐德峰¹, 刘 阳², 陈 宏², 唐晓山³

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088; 2. 国家海产品质量监督检验中心(湛江), 广东 湛江 524025;
3. 湛江师范学院电镜室, 广东 湛江 524022)

摘 要: 目的: 对纳豆菌抗菌脂肽抑制副溶血弧菌的抑菌机理进行探讨。方法: 通过纳豆菌抗菌脂肽对副溶血弧菌生长曲线、细胞超微结构、细胞膜通透性、细胞 DNA 的作用、细胞蛋白的合成、细胞代谢的影响等方面的研究, 探讨纳豆菌抗菌脂肽抑制副溶血弧菌的机理。结果: 抗菌脂肽可以使副溶血弧菌细胞膜通透性增加, 使得细胞内具有紫外吸收的大分子物质泄漏到细胞外; 扫描电镜结果表明抗菌脂肽可以导致副溶血弧菌细胞壁破裂或形成孔洞; 抗菌脂肽能够和副溶血弧菌 DNA 体外结合, 导致 DNA 最大吸收峰发生了轻微的蓝移, 且产生增色效应; SDS-PAGE 分析表明抗菌脂肽对副溶血弧菌蛋白表达未见有明显影响; 当抗菌脂肽的质量浓度达到 0.6 MIC 以上时, 其对副溶血弧菌代谢活力的抑制作用显著。结论: 纳豆菌抗菌脂肽可使副溶血弧菌的细胞膜通透性增加, 或形成孔洞导致细胞内一些物质泄漏, 使细胞生长受到抑制, 进而导致死亡。

关键词: 抗菌脂肽; 纳豆菌; 副溶血弧菌; 抑菌机理

Antibacterial Mechanism of Lipopeptide from *Bacillus natto* against *Vibrio parahaemolyticus*

LIU Huan-ming¹, SUN Li-jun^{1,*}, WANG Ya-ling¹, XU De-feng¹, LIU Yang², CHEN Hong², TANG Xiao-shan³

(1. School of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. National Seafood Quality Supervision Inspection Center (Zhanjiang), Zhanjiang 524025, China;

3. Department of Scanning Electron Microscopy, Zhanjiang Normal College, Zhanjiang 524022, China)

Abstract: Objective: To investigate the antibacterial mechanism of lipopeptide from *Bacillus natto* against *Vibrio parahaemolyticus*. Method: The effects of antibacterial lipopeptide from *Bacillus natto* on the growth, cell ultrastructure, cell membrane permeability, protein synthesis, and respiratory metabolism of *Vibrio parahaemolyticus* were evaluated. Results: The antibacterial lipopeptide increased cell membrane permeability of *Vibrio parahaemolyticus*, causing intracellular macromolecules with ultraviolet absorption to leak out of the cells. Under scanning electron microscope, it was observed that the cell wall of *Vibrio parahaemolyticus* was ruptured by the antibacterial lipopeptide and holes were formed. The antibacterial lipopeptide could be bound to DNA from *Vibrio parahaemolyticus* in vitro, resulting in slight blue shift of DNA maximum absorption and hyperchromic effect. SDS-PAGE suggested that the antibacterial lipopeptide had no apparent effect on protein synthesis in *Vibrio parahaemolyticus* cells. The respiratory metabolism of *Vibrio parahaemolyticus* was strongly inhibited by the antibacterial lipopeptide when its concentration was higher than 0.6 MIC. Conclusion: The antibacterial lipopeptide from *Bacillus natto* increases cell membrane permeability of *Vibrio parahaemolyticus*, causing intracellular materials to leak out of the cells and consequently resulting in growth inhibition and even death of the cell.

Key words: antibacterial lipopeptide; *Bacillus natto*; *Vibrio parahaemolyticus*; antibacterial mechanism

中图分类号: Q93; TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)15-0201-05

海产品营养丰富、水分高, 非常适合微生物的生长和繁殖。近年来由食源性致病菌引发的海产品食物中

毒常有报道, 不仅致病菌的种类不断增加, 而且污染海产品的数量也在不断扩大。国家食源性疾病监测网数

收稿日期: 2011-06-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30972287)

作者简介: 刘唤明(1978—), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为食品微生物。E-mail: lhmgdhydx@sina.com

* 通信作者: 孙力军(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为水产品安全与质量控制。E-mail: dfsun01@126.com

据显示,沿海省份副溶血性弧菌引起的食物中毒已高居微生物性食物中毒的首位^[1]。该菌在水产品中的天然带菌率较高,温暖季节在海虾中可高达90%^[2]。因此控制海产品中的致病菌,特别是副溶血性弧菌对于保证水产品安全性具有重要意义。

纳豆菌是中国和日本传统发酵食品——纳豆的生产菌,已被使用了2000多年。该菌具有较强的抗菌活性,国内一些学者将其应用于食品防腐显示了很好的效果^[3-5]。本研究组在前期的研究中从纳豆中分离了一株纳豆芽孢杆菌NT-6菌株,该菌可以产生Surfactin、Iturin、Fengycin三类抗菌脂肽类物质^[3],并证实其在食品中应用是安全的^[6]。纳豆菌抗菌脂肽具有广谱的抗菌活性,对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、酵母菌和霉菌皆有抗菌作用^[3-4],它克服了目前在食品工业广泛应用的乳酸链球菌素(Nisin)只能用于酸性条件下G⁺菌控制,而对海产品中污染最严重的致病菌副溶血弧菌无抑制作用的局限性,将为海产品食源性致病菌绿色安全控制提供新的思路。

抗菌肽类的抗菌机理报道较多,一般认为膜攻击理论是抗菌脂肽的最主要作用途径,也有抑制细胞呼吸^[7]、抑制蛋白质合成^[8-9]等方面的报道。杨丽莉等^[10]研究了枯草芽孢杆菌脂肽可改变嗜水气单胞菌细胞膜通透性,还可造成细胞壁缺失。而关于抗菌脂肽是否存在直接作用于菌体的遗传物质、代谢过程、蛋白质合成等方面则鲜见报道,本实验则从副溶血弧菌菌体细胞超微结构、膜通透性、与DNA体外作用和蛋白质合成等方面探讨纳豆菌抗菌脂肽抑制副溶血弧菌的机理,以期对纳豆菌抗菌脂肽控制海产品中的副溶血弧菌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802)由广东海洋大学食品学院食品微生物实验室提供,购于广东省微生物研究所。纳豆芽孢杆菌(*Bacillus natto* NT-6)^[3]由广东海洋大学食品科技学院水产品食源性病原微生物及毒素绿色控制研究室提供。

2.5%戊二醛固定液、氯化碘硝基四唑紫均为国产分析纯。

1.2 培养基

LB液体培养基(g/L):牛肉膏5、蛋白胨10、NaCl5、pH7.2。

改良Landy培养基:葡萄糖10.0g、谷氨酸钠5.0g、MgSO₄ 0.5g、KCl 0.78g、KH₂PO₄ 1.0g、FeSO₄ 0.05mg、CuSO₄ 0.16mg、MnSO₄ 5.0mg,蒸馏水1000mL。

氯化钠结晶紫增菌液:蛋白胨20g、氯化钠40g、

0.01%结晶紫溶液5mL、蒸馏水1000mL,校正pH值至9.0,分装后121℃高压灭菌20min备用。

1.3 仪器与设备

HZQ-F160振荡培养箱 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;LS-BSO立式压力蒸汽灭菌器 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;FDU-1100真空冷冻干燥机 东京理化器械株式会社;UV-2550紫外分光光度计 日本岛津公司;DYY-6C型稳压稳流电泳仪 北京六一仪器厂;UVP GDS-8000凝胶成像系统 美国UVP公司;SEM XL-30型扫描电子显微镜 美国Philips公司。

1.4 方法

1.4.1 纳豆菌抗菌脂肽的制备

取斜面保存的*Bacillus natto* NT-6菌株,接种于LB液体培养基中,于37℃、150r/min条件下,恒温摇床振荡培养24h作为种子液。按照5%接种量接种于改良的Landy培养基,于33℃、180r/min培养38h。5000r/min离心15min除去菌体,上清液调pH值至2.0,低温过夜,5000r/min离心15min取沉淀用甲醇溶解,调节pH值至7.0,于磁力搅拌器上低温搅拌5h,10000r/min离心20min后得到的上清液即为含脂肽的甲醇溶液,然后利用低温冷冻干燥除去甲醇。

1.4.2 最小抑菌质量浓度(MIC)测定

液体倍比稀释法:用氯化钠结晶紫增菌液将抗菌脂肽倍比稀释共稀释10次;同时设空白对照和阴性对照。取对数生长期的副溶血弧菌培养液稀释使其菌体浓度为10⁵CFU/mL,分别加入以上稀释后含不同质量浓度抗菌脂肽的氯化钠结晶紫增菌液液体培养基中,于37℃、150r/min培养18~20h后观察副溶血弧菌的生长情况,以副溶血弧菌不生长的最小稀释度的抗菌脂肽质量浓度即为MIC。

1.4.3 对副溶血弧菌生长曲线的影响实验

取活化后的菌种按1%接种量分别接种于5个100mL氯化钠结晶紫增菌液培养基中,于37℃、150r/min培养,分别于培养的不同时间点取样测OD_{540nm}值,绘制生长曲线。分组如下:a组为对照组,于培养的同时加入1mL无菌水;b组和c组分别为培养0、6h后加入终质量浓度为0.8MIC抗菌脂肽;d组和e组分别为培养12h后加入终质量浓度为1MIC、3MIC抗菌脂肽。

1.4.4 扫描电子显微镜观察实验

将培养至对数生长期的副溶血弧菌于5000r/min离心10min,然后用灭菌生理盐水洗涤,重复操作3次然后用生理盐水调节菌体浓度为10⁸CFU/mL,即为副溶血弧菌细胞菌悬液。取制备的副溶血弧菌细胞菌悬液,加入抗菌脂肽并且使其终浓度为3MIC,然后将其于37℃孵育1h。将对照组和实验组培养的副溶血弧菌液离心收

集菌体,用2.5%戊二醛固定2h后涂片,将样品自然风干,干燥后的标本放入高真空蒸发器中,喷金镀膜,扫描电镜下观察,拍照。

1.4.5 抗菌脂肽对细胞膜通透性的影响实验

用氯化钠结晶紫增菌液培养副溶血弧菌至对数生长期,5000r/min离心10min收集菌体,然后用灭菌生理盐水洗涤,重复操作3次后用生理盐水稀释调节菌体浓度为 10^6 CFU/mL。稀释后的菌悬液中加入抗菌脂肽,使其终质量浓度为1MIC,并放于37℃恒温振荡器中100r/min振荡。分别在0、15、30、45、60、75、90、105、120min取出10mL菌悬液,经 $0.22\mu\text{m}$ 纤维素酯微孔膜过滤,滤液于260nm波长处测定其OD值。

1.4.6 抗菌脂肽与副溶血弧菌染色体DNA体外作用实验

副溶血弧菌培养至对数生长期时,5000r/min离心10min收获菌体细胞,采用CTAB法提取副溶血弧菌染色体DNA。在0.1mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.2)介质中,DNA与抗菌脂肽于37℃避光反应不同时间后,于紫外分光光度计扫描其220~400nm范围内OD的变化,检测其与DNA的相互作用。

1.4.7 副溶血弧菌菌体蛋白SDS-PAGE电泳分析

副溶血弧菌培养至对数生长期时,按5%接种量分别接种于100mL氯化钠结晶紫增菌液液体培养基中,分为对照组和处理组,对照组加入1mL无菌水、处理组加入抗菌脂肽使其终质量浓度为0.8MIC,继续于37℃、150r/min培养,分别于6、12h取样,稀释成相同的吸光度后取样10mL于5000r/min离心10min,然后用生理盐水洗涤两次,取沉淀加100 μL 无菌水和10 μL 上样缓冲液于100℃保温5min,再次离心沉淀后取20 μL 上清液进行SDS-PAGE凝胶电泳。选用浓缩胶5.0%,分离胶12%的SDS-PAGE凝胶系统,染色液为0.1%的考马斯亮蓝溶液。

1.4.8 抗菌脂肽对代谢活力的影响实验

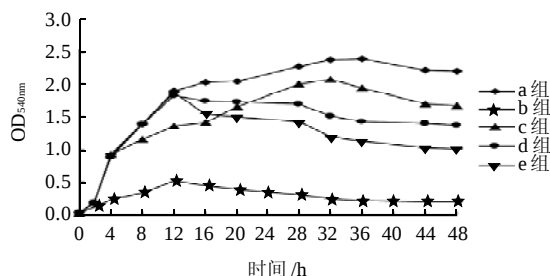
将培养至对数生长期的副溶血弧菌于5000r/min离心10min,收集菌体。然后用灭菌生理盐水洗涤,重复操作3次后用生理盐水调节菌体浓度 10^8 CFU/mL。往菌悬液中加入抗菌脂肽使其终质量浓度分别为0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2MIC,于37℃保温作用1h。于10000r/min离心5min,收集菌体,然后用灭菌生理盐水洗涤,重复操作2次后用生理盐水调节至 10^8 CFU/mL,加入氯化碘硝基四唑紫,使其终浓度为1mmol/L,并于37℃条件下作用30min,然后测定630nm波长处的OD值,判断抗菌脂肽对副溶血弧菌细胞代谢活力的影响。

2 结果与分析

2.1 MIC测定结果

当纳豆菌抗菌脂肽的质量浓度为0.6mg/mL时副溶血弧菌不生长,而当脂肽的质量浓度为0.3mg/mL时副溶血弧菌生长,因而脂肽对副溶血弧菌的MIC为0.6mg/mL。

2.2 纳豆菌抗菌脂肽对副溶血弧菌生长曲线的影响



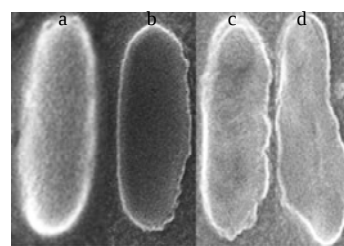
a 为对照组; b、c 分别为 0、6h 加入 0.8MIC 抗菌脂肽; d、e 分别为 12h 加入 1 MIC 和 3 MIC 抗菌脂肽。

图1 纳豆菌抗菌脂肽对副溶血弧菌生长曲线的影响

Fig.1 Effect of antibacterial lipopeptide from *Bacillus natto* on *Vibrio parahaemolyticus* growth

由图1可知,在0h和6h加0.8MIC抗菌脂肽对副溶血弧菌的生长均有较好的抑制作用,但是在6h后加抗菌脂肽,由于菌体细胞正处于生长代谢的旺盛状态,且细胞浓度的增加,抗菌脂肽抑菌作用有所减弱。在对数期末12h加入抗菌脂肽,可使OD_{540nm}值不断减小,说明抗菌脂肽可以溶解副溶血弧菌而起到杀菌作用。此外,结果还显示,随着加入的抗菌脂肽质量浓度由1MIC增加到3MIC,OD_{540nm}值减小幅度增加,说明在一定范围内抗菌脂肽的溶菌作用随其质量浓度的增加而增强。

2.3 副溶血弧菌的细胞显微特征



a.对照组; b、c、d 均为 3MIC 抗菌脂肽处理 1h 的菌悬液。

图2 扫描电镜观察抗菌脂肽对副溶血弧菌形态结构的影响($\times 25000$)

Fig.2 SEM observation of the effect of antibacterial lipopeptide from *Bacillus natto* on morphology of *Vibrio parahaemolyticus* cells revealed by ($\times 25000$)

由图2可知,对照组副溶血弧菌菌体形状为短杆状,菌体边缘整齐、清晰;而加入3MIC抗菌脂肽处理1h的副溶血弧菌菌体边缘不整,菌体表面有凹陷。说明加入抗菌脂肽处理1h后,副溶血弧菌细胞壁已经破裂或形成孔洞。

2.4 纳豆菌抗菌脂肽作用时间对细胞膜通透性的影响

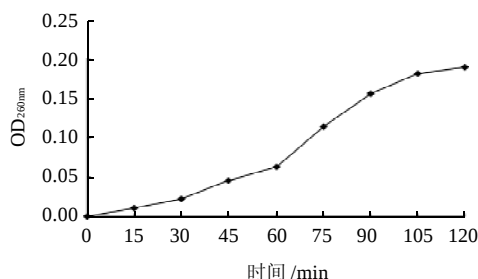


图3 纳豆菌抗菌脂肽作用时间对细胞膜通透性的影响

Fig.3 Temporal changes in cell membrane permeability of *Vibrio parahaemolyticus* treated with lipopeptide from *Bacillus natto*

由图3可知,随着纳豆菌抗菌脂肽作用时间的延长,菌悬液的OD_{260nm}值逐渐升高。表明抗菌脂肽的加入可以导致副溶血弧菌的细胞膜通透性增加,使得在正常状态下不能够透过细胞膜的具有紫外吸收的大分子物质通过细胞膜泄漏到细胞外。

2.5 抗菌脂肽和副溶血弧菌DNA的相互作用

表1 抗菌脂肽和副溶血弧菌DNA的相互作用

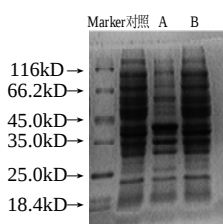
Table 1 Slight blue shift of DNA maximum absorption and hyperchromic effect as a result of interaction with added lipopeptide from *Bacillus natto*

抗菌脂肽与DNA作用时间/h	最大吸收峰波长/nm	OD
对照组	257	0.189
0	256	0.261
2	256	0.262
4	256	0.263
6	256	0.265

注: 对照组为未加抗菌脂肽的副溶血弧菌DNA。

由表1可知,抗菌脂肽的加入使DNA的最大吸收峰发生了轻微的蓝移,并且DNA紫外吸收值明显升高,产生了增色效应。DNA的最大吸收峰发生了蓝移可能是由于抗菌脂肽与副溶血弧菌细胞DNA发生了嵌插作用,抗菌脂肽分子的 π 轨道和DNA碱基 π 轨道相互耦合所造成的;并且随着抗菌脂肽与DNA作用时间延长,抗菌脂肽嵌入DNA分子沟槽中,使DNA收缩的构象趋于松散,所以发生了增色效应。

2.6 纳豆菌抗菌脂肽对蛋白质合成的影响



对照组为不加抗菌脂肽培养12h; A、B分别为0.8MIC抗菌脂肽培养6h和12h。

图4 副溶血弧菌SDS-PAGE电泳图谱

Fig.4 SDS-PAGE showing the effect of antibacterial lipopeptide from *Bacillus natto* on protein synthesis in *Vibrio parahaemolyticus*

由图4可知,加0.8MIC抗菌脂肽培养12h时的样品与未加抗菌脂肽培养12h的对照相比,没有明显的特征带消失,且绝大多数蛋白带的亮度和对照差不多,仅仅116kD附近的蛋白带的亮度要比对照浅一些。这表明抗菌脂肽对副溶血弧菌蛋白表达未见有明显影响,但是抗菌脂肽可以抑制细胞内某种蛋白质的合成。关于其是否可以通过影响该蛋白质的合成而导致菌体细胞生长受阻或死亡还需要进一步深入研究。

2.7 纳豆菌抗菌脂肽对细胞代谢的影响

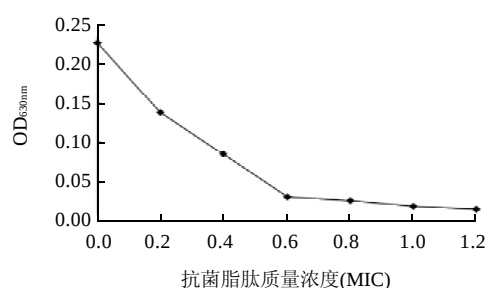


图5 纳豆菌抗菌脂肽质量浓度对菌体代谢活力的影响

Fig.5 Effect of antibacterial lipopeptide from *Bacillus natto* on cell metabolism in *Vibrio parahaemolyticus*

活细胞在脱氢酶作用下生成一种活化氢离子,该离子可以将氯化碘硝基四唑蓝还原成稳定的甲瓊,可以利用甲瓊生成的速率来推测细胞的代谢活力。细胞代谢活力越弱产生的氢离子越少,还原生成的甲瓊越少,则OD_{630nm}值越小^[11]。由图5可知,随着抗菌脂肽质量浓度的增加,其对副溶血弧菌代谢活力的抑制作用逐渐增强;当抗菌脂肽质量浓度达到0.6MIC以上时,其对副溶血弧菌代谢活力的抑制作用非常显著。这可能是由于抗菌脂肽作用于副溶血弧菌,使其细胞膜通透性增加,细胞里面一些物质发生了泄漏,使其代谢活力受到了抑制。

3 结论与讨论

本实验探讨了纳豆菌抗菌脂肽抑制副溶血弧菌的机理。结果表明,纳豆菌抗菌脂肽不但对副溶血弧菌的生长具有较强的抑制作用,而且还可使菌体溶解而起到杀菌作用;纳豆菌抗菌脂肽可以使副溶血弧菌的细胞膜通透性发生改变,使得在正常状态下不能够透过细胞膜的具有紫外吸收的大分子物质通过细胞膜泄漏到细胞外;当抗菌脂肽的质量浓度达到0.6MIC以上时,对副溶血弧菌代谢活力的抑制作用显著;扫描电镜结果表明,在纳豆菌抗菌脂肽作用下,副溶血弧菌细胞壁已经形成孔洞。这些结果表明,纳豆菌抗菌脂肽作用副溶血弧菌可使其细胞膜通透性增加,或细胞形成孔洞导致细胞内一些物质泄漏,使细胞生长受到抑制,进而导致死亡。

有研究表明,某些抗菌肽可与细菌染色体DNA发生相互作用,进而导致DNA的复制、转录、表达功能受抑制^[12-13]。本研究中秋脂肽虽然能够和副溶血弧菌染色体DNA体外结合导致DNA最大吸收峰的改变,且产生增色效应。但是抗菌脂肽进入细胞后,能否到达细胞核和细菌染色体DNA发生作用,还需进一步研究。并且从抗菌脂肽对蛋白质合成的影响结果来看,抗菌脂肽对副溶血弧菌蛋白表达并未见有明显影响,没有特征性条带的消失,只是对某种蛋白质的合成量有影响。因此推测抗菌脂肽并未在细胞内和细菌染色体DNA发生作用,进而影响蛋白质的合成。某种蛋白质的合成量有所减少,这可能是由于在抗菌脂肽的作用下,细胞膜通透性增加,该蛋白质可能渗透到细胞外面去了,或者是这部分蛋白质合成相关的物质渗透到细胞外,进而使得其在细胞内的含量减少。

参考文献:

- [1] 刘秀梅,陈艳,王晓英,等. 1992—2001年食源性疾病暴发资料分析:国家食源性疾病预防网[J]. 卫生研究, 2004, 33(6): 725-727.
- [2] 俞莺,宁喜斌. 对虾副溶血性弧菌的风险评估[J]. 现代食品科技, 2006, 23(5): 184-186.
- [3] 孙力军,王雅玲. 一种新型抗菌肽水产生物保鲜剂APNT-6的开发和应用[C]//中国食品科学技术学会第六届年会暨第五届东西方食品业高层论坛. 北京, 2009.
- [4] 钟青萍,谢俊杰,余世望. 纳豆菌的分离鉴定及其抗菌活性[J]. 食品科学, 2002, 23(10): 109-112.
- [5] 钟青萍. 纳豆菌抗菌蛋白在食品防腐中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2003(3): 66-69.
- [6] 孙力军,王雅玲. 一种新型抗菌肽水产生物保鲜剂APNT-6的急性毒性评价[C]//中国食品科学技术学会第六届年会暨第五届东西方食品业高层论坛. 北京, 2009.
- [7] FEHLBAUM P, BULET P, CHERNYSH S, et al. Structure activity analysis of thanatin a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 1221-1225.
- [8] KANYSHKOVA T G, SEMENOV D V, BUNOVA V N, et al. Human milk lactoferrin binds two DNA molecules with different affinities[J]. FEBS Lett, 1999, 451: 235-237.
- [9] 宫霞,施用晖,乐国伟. 抗菌活性肽与细菌染色体DNA的相互作用机理[J]. 自然科学进展, 2004, 14(5): 509-514.
- [10] 杨丽莉,吕凤霞,别小妹,等. 枯草芽孢杆菌抗菌脂肽对嗜水气单胞菌抑菌效果[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 193-198.
- [11] 黄现青. *Bacillus subtilis* fmbJ产生的脂肽抗微生物效果及安全性评价[D]. 南京:南京农业大学, 2006.
- [12] BROGDEN K A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3: 238-250.
- [13] GUEGUEN Y, BERNARD R, JULIE F, et al. Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin[J]. Mol Immunol, 2008, 46(4): 516-522.