

螺旋藻-壳寡糖生物被膜抑制剂的制备、表征及活性评价

孙蕊婕^{1,2}, 徐童², 刘杨洋^{1,2}, 张黎明², 焦思明², 张毓宸², 高晓冬^{1,2*}, 王倬^{2*}, 杜昱光²

1 江南大学生物工程学院, 江苏 无锡 214122

2 中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室, 北京 100080

孙蕊婕, 徐童, 刘杨洋, 张黎明, 焦思明, 张毓宸, 高晓冬, 王倬, 杜昱光. 螺旋藻-壳寡糖生物被膜抑制剂的制备、表征及活性评价[J]. 生物工程学报, 2023, 39(10): 4135-4149.

SUN Ruijie, XU Tong, LIU Yangyang, ZHANG Liming, JIAO Siming, ZHANG Yuchen, GAO Xiaodong, WANG Zhuo, DU Yuguang. Preparation, characterization and activity evaluation of *Spirulina*-chitooligosaccharides capable of inhibiting biofilms[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(10): 4135-4149.

摘要: 病原菌形成的生物被膜严重威胁人类健康, 显著增强了病原菌的耐药性, 针对生物被膜的特效药物亟待研究。从虾、蟹壳等中提取得到的壳寡糖是一种天然碱性寡糖, 具有良好的杀菌效果, 但其对生物被膜的抑制作用仍有待提高。螺旋藻(*Spirulina*, SP)是一种表面带负电荷的微藻, 其与壳寡糖形成的复合物可能发挥协同增效杀灭生物被膜深处病原菌的作用。针对提升壳寡糖的抑生物被膜作用, 本研究首先通过浊度法筛选得到了杀菌效果显著的壳寡糖, 并通过静电吸附作用将壳寡糖与螺旋藻结合, 完成螺旋藻@壳寡糖(*Spirulina*@Chitooligosaccharides, SP@COS)复合物的制备。通过测定 zeta 电位、粒径和荧光标记等方法表征了壳寡糖和螺旋藻的结合情况, 紫外-可见吸收光谱(ultraviolet-visible absorbance spectroscopy, UV-Vis)结果显示螺旋藻对壳寡糖的包封率达 90%, 负载率达 16%。制备的 SP@COS 对细菌、真菌生物被膜都有明显的增效抑制作用, 且这种抑制效果主要是通过深入生物被膜内部、破坏细胞结构所实现。这些结果显示了螺旋藻-壳寡糖复合物具备作为生物被膜抑制剂的潜力, 为提高壳寡糖的抑生物被膜作用、解决病原菌的危害提供了理论基础与新的思路。

关键词: 生物被膜; 抑菌; 微藻; 螺旋藻; 壳寡糖

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFD0902000)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFD0902000).

*Corresponding authors. E-mail: GAO Xiaodong, xdgao@ipe.ac.cn; WANG Zhuo, wangzhuo@ipe.ac.cn

Received: 2023-02-28; Accepted: 2023-04-04; Published online: 2023-04-20

Preparation, characterization and activity evaluation of *Spirulina*-chitooligosaccharides capable of inhibiting biofilms

SUN Ruijie^{1,2}, XU Tong², LIU Yangyang^{1,2}, ZHANG Liming², JIAO Siming², ZHANG Yuchen², GAO Xiaodong^{1,2*}, WANG Zhuo^{2*}, DU Yuguang²

1 School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

Abstract: The biofilms formed by pathogenic microorganisms seriously threaten human health and significantly enhance drug resistance, which urgently call for developing drugs specifically targeting on biofilms. Chitooligosaccharides extracted from shrimp and crab shells are natural alkaline oligosaccharides with excellent antibacterial effects. Nevertheless, their inhibition efficacy on biofilms still needs to be improved. *Spirulina* (SP) is a microalga with negatively charged surface, and its spiral structure facilitates colonization in the depth of the biofilm. Therefore, the complex of *Spirulina* and chitooligosaccharides may play a synergistic role in killing pathogens in the depth of biofilm. This research first screened chitooligosaccharides with significant bactericidal effects. Subsequently, *Spirulina*@Chitooligosaccharides (SP@COS) complex was prepared by combining chitooligosaccharides with *Spirulina* through electrostatic adsorption. The binding of the complex was characterized by zeta potential, z-average size, and fluorescence labeling. Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis) showed the encapsulation efficiency and the drug loading efficiency reached up to 90% and 16%, respectively. The prepared SP@COS2 exhibited a profound synergistic inhibition effect on bacterial and fungal biofilms, which was mainly achieved by destroying the cell structure of the biofilm. These results demonstrate the potential of *Spirulina*-chitooligosaccharides complex as a biofilm inhibitor and provide a new idea for addressing the harm of pathogenic microorganisms.

Keywords: biofilm; anti-biofilm; microalga; *Spirulina*; chitooligosaccharides

病原菌形成的生物被膜往往造成持续性病原微生物感染^[1], 引发耐药性和炎症^[2-3]。据统计, 人体 80%反复发生的微生物感染与生物被膜的形成有关^[4]。病原菌形成生物被膜可提升耐药性 1 000 倍以上^[5]。耐磺胺类化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、耐青霉素的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等耐药细菌不断出现, 降低了抗生素的应用效果^[6]。研究发现生物被膜可以通过促进耐药基因的横向转移, 加速耐药性的传播^[7]。因此, 迫切需要有效的治疗策略来控制病原性生物被膜的形成和感染。

螺旋藻 (*Spirulina*, SP) 是一种有 35 亿年生命史的光能自养型藻类, 属于蓝藻门颤藻科 (*Cyanobacteria Oscillatoriaceae*)^[8]。螺旋藻富含蛋白质、矿物质和维生素等多种营养元素^[9], 被美国国家航空航天局 (National Aeronautics and Space Administration, NASA) 和欧洲航天局 (European Space Agency, ESA) 推荐为长期太空任务的主要食物之一^[10], 2004 年也被我国批准为普通食品原料, 并在卫生部门、食品工业和水产养殖中获得了广泛普及^[11-12]。螺旋藻含有丰富的叶绿素, 在适当的激发光下, 会发出强烈

的红色荧光便于识别, 同时也会将产生的氧气转化为活性氧, 从而起到一定的杀菌作用^[13]。同时, 螺旋藻的螺旋结构特点使得其容易被生物表面捕获, 从而延长驻留时间^[13]。

壳寡糖是壳聚糖解聚反应产生的聚合度 2–20 的壳聚糖低聚物^[14–15], 对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌都有良好的抑制效果^[16–17], 目前已经广泛应用于养殖业、食品业和医药业等^[18]。壳寡糖对生物被膜也有一定抑制效果, 但作用浓度较高, 其活性有待进一步增强。由于螺旋藻表面带负电荷^[19], 可以通过静电吸附作用装载带正电荷的壳寡糖, 同时螺旋藻的结构特点可能更容易与生物被膜结合, 在激发光刺激下, 释放活性氧破坏生物被膜的完整性, 并使得装载的壳寡糖更易进入被膜深处定点释放, 增强抗菌活性, 起到协同作用, 如图 1 所示。基于此, 本研究探索了 *Spirulina*@Chitooligosaccharides (SP@COS) 复合物的制备, 对复合物开展了结构表征及抗菌活性研究, 探索该复合物用于抗生物被膜的新策略。

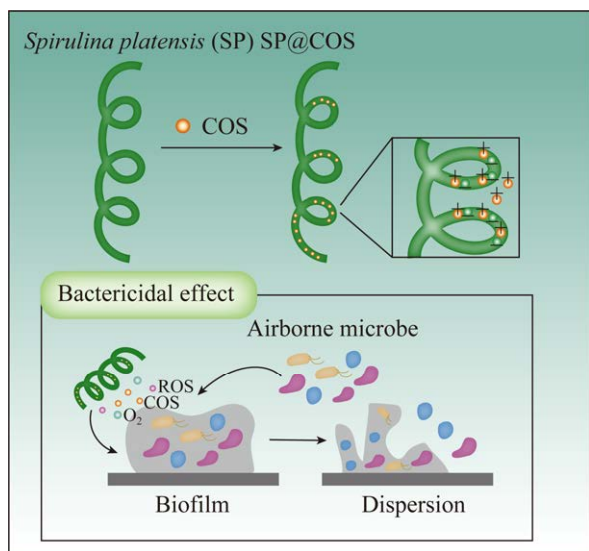


图 1 SP@COS 的形成及破坏生物被膜的过程
Figure 1 The formation of SP@COS and the process of destroying biofilm.

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌株和藻种: 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由中国科学院青岛生物能源与过程研究所马波研究员惠赠, 白色念珠菌(*Candida albicans* CGMCC 2.3629)购自中国普通微生物菌种保藏管理中心, 螺旋藻(*Spirulina*)由中国科学院过程工程研究所丛威研究员惠赠。

试剂: 异硫氰酸荧光素、FITC 标记麦胚凝集素、荧光增白剂 28 购自 Sigma-Aldrich 公司, 蛋白胨、酵母膏购自 Oxoid 公司, 葡萄糖、氯化钠购自国药集团化学试剂有限公司, 琼脂购自北京索莱宝科技有限公司, 壳寡糖样品由中科荣信(苏州)生物科技有限公司提供。

仪器与设备: SQ510C 立式压力蒸汽灭菌器购自 YAMATO 公司, SB 5200DT 超声波清洗机购自宁波新芝生物科技股份有限公司, DHP 9052 电热恒温培养箱购自上海一恒科学仪器有限公司, BSC 生物安全柜购自北京东联哈尔仪器制造有限公司, DGG 9240AD 购自电热恒温鼓风干燥箱上海森信实验仪器有限公司, ZQZY 78BN 振荡培养箱购自上海知楚仪器有限公司, Infinite 200 PRO 酶标仪购自 Tecan 公司, 荧光倒置显微镜购自徕卡公司, Centrifuge 5424 高速离心机购自艾本德股份公司, FD 1D-80 超低温冰箱购自 Thermo Fisher 公司, NANO ZS 动态光散射粒度仪购自马尔文公司, Leica SP8 STED 3X 超分辨共聚焦显微镜购自徕卡公司。

1.2 方 法

1.2.1 菌株的复苏、传代及活化

用接种环从 -80°C 甘油保存的保菌管中挑取菌液 1 环, 采用平板划线法接种到固体平板上, 倒置培养 24 h 后, 再挑取单菌落接种到新

的固体平板上, 倒置培养 24 h, 4 °C 冰箱储存备用^[20]。

挑取大肠杆菌或金黄色葡萄球菌的单菌落接种到 LB 液体培养基中于 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h, 活化备用; 挑取白色念珠菌的单菌落接种到 YPD 液体培养基中于 30 °C、200 r/min 振荡培养 12 h, 活化备用。

1.2.2 浮游菌的抑制实验

制备 16 mg/mL 的不同壳寡糖样品母液 (COS1、COS2、COS3、COS4, 详见表 1), 过 0.22 μm 滤膜, 存放于 4 °C 冰箱待用。

参考 Sim 等^[21]的方法测定抑菌率。对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 以 2×LB 液体培养基将菌浓度调整为 2×10^7 CFU/mL, 再取 500 μL 的菌液加入 96 深孔板, 再分别加入 500 μL 不同浓度样品溶液, 此时菌浓度为 1×10^7 CFU/mL, 同时设置阴性对照组 (500 μL 菌液+500 μL 无菌水)、样品基底对照组 (500 μL 壳寡糖样品溶液+500 μL 2×LB 液体培养基)、培养基底对照组 (500 μL 无菌水+500 μL 2×LB 液体培养基), 在 37 °C 的温度下, 按照 200 r/min 振荡培养 24 h, 于酶标仪测定 OD_{600} 值, 并按照以下公式计算抑菌率:

$$\text{抑菌率} = \frac{OD(\text{阴性对照} - \text{培养基底对照}) - OD(\text{实验组} - \text{样品基底对照})}{OD(\text{阴性对照} - \text{培养基底对照})} \times 100\%。$$

对于白色念珠菌, 实验方法与上述相似,

但需将 LB 液体培养基替换为 YPD 液体培养基, 同时振荡培养温度调整为 30 °C。

1.2.3 螺旋藻的培养、生长监测及液体定量

参考 Mao 等^[12]、Cardoso 等^[22]的方法并加以修改, 将适量新鲜螺旋藻藻种接种到无菌 Zarrouk 培养基中, 放于 30 °C、2 000 lx、120 r/min 的振荡培养箱中培养。

每日定时取藻液测定 OD_{600} 值。同时取干净的载玻片, 滴加螺旋藻液, 于荧光显微镜明场和荧光场观察螺旋藻的生长状态, 并拍照记录。

参考 Li 等^[23]的方法并稍加改进, 对螺旋藻进行液体定量。取 30 mL 螺旋藻原液干燥至恒重, 称量; 分别吸取不同体积藻体原液, 定容至 30 mL, 在 570 nm 波长下测定光密度并作图。

1.2.4 SP@COS2 复合物的制备

参考 Zhong 等^[13]的方法, 取无菌水洗涤 3 次后的 0.5 mg/mL 的螺旋藻 10 mL 加入到 1 mL 不同浓度的 COS2 溶液中, 30 °C、180 r/min 振荡孵育 12 h。以无菌水洗涤 3 次培养液, 倒掉上清液, 复溶, 即得不同浓度的 SP@COS2 复合物溶液。

1.2.5 SP@COS2 负载率的表征

(1) zeta 电位、粒径的测定

取 1 mL 不同浓度的 SP@COS2 溶液, 加入动态光散射粒度仪的样品池中, 设定 Zetasizer Software 程序, 根据光通过溶液时, 样品颗粒

表 1 不同壳寡糖的结构特点

Table 1 Structural characteristics of different chitooligosaccharides

Type of chitooligosaccharides	Molecular weight (Da)	Degree of polymerization	Degree of deacetylation (%)	Monosaccharide composition
COS1	800	2-8	95	Mainly glucosamine, a small amount of N-acetyl glucosamine
COS2	8 000	2-20	95	Mainly glucosamine, a small amount of N-acetyl glucosamine
COS3	600	2-7	5	Mainly N-acetyl glucosamine, a small amount of glucosamine
COS4	1 000	2-20	63	Glucosamine and N-acetyl glucosamine

对光的散射情况,得到光强度的变化,再根据光强度波动变化带入光强相关函数方程,以计算出粒径大小,同时通过测定光信号的变化及正负离子速度变化得到离子淌度,从而计算出 zeta 电位。

(2) 荧光染色

采用异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate isomer, FITC) 标记 COS2^[24], 得到 COS2-FITC 化合物, 并按照 2.2.4 的方法制备 SP@COS2-FITC, 于超分辨共聚焦显微镜 488、561 nm 通道下观察螺旋藻和壳寡糖的结合情况。

分别用 FITC 标记的麦胚凝集素 (FITC labeled wheat germ agglutinin, FITC-WGA)^[25] 和荧光增白剂 28 (fluorescent brightener 28, FB28)^[26] 对 SP@COS2 进行识别, 30 °C 避光孵育 30 min, 离心去上清, 加入超纯水洗涤 3 次, 于超分辨共聚焦显微镜 405、488、561 nm 通道下观察螺旋藻和壳寡糖的结合情况。

(3) 紫外-可见光谱法 (ultraviolet-visible absorbance spectroscopy, UV-Vis)

参考 Zhong 等^[19]的方法, 将不同浓度的 COS2-FITC 与螺旋藻共同孵育, 取离心后的上清液以及 COS2-FITC 溶液, 在 300–800 nm 间进行 UV-Vis 光谱分析, 结合 COS2-FITC 标准曲线, 从最大 OD 波长处收集上清液的吸光度来定量载药率 (drug loading efficiency, DLE) 和包封率 (encapsulation efficiency, EE)。

$$\text{载药率} = \frac{(\text{药总量} - \text{上清中药含量})}{(\text{载体总量} + \text{药总量} - \text{上清中药含量})} \times 100\%。$$

$$\text{包封率} = \frac{(\text{药总量} - \text{上清中药含量})}{\text{药总量}} \times 100\%。$$

1.2.6 SP@COS2 对生物被膜的抑制实验

参照 Khot^[27]的方法并稍加改动进行测试。

对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 分别取 200 μL 以磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 洗涤, LB 液体培养基复溶的浓度为 10⁷ CFU/mL 的菌液于 96 孔板中, 37 °C 培养 24 h; 吸出菌液, 以 PBS 轻柔清洗 3 次, 再分别加入 200 μL 不同样品溶液, 光照培养 24 h; 吸出样品溶液, 以 PBS 轻柔清洗 3 次, 再加入 200 μL 的 PBS 吹打混匀, 收集菌液, 适当稀释后, 取 200 μL 溶液于 LB 固体平板上, 涂布均匀, 37 °C 培养 24 h, 根据单菌落数计算抑菌率, 公式如下:

生物被膜抑制率 =

$$\frac{\text{空白组菌落数} - \text{实验组菌落数}}{\text{空白组菌落数}} \times 100\%。$$

对于白色念珠菌, 与上述实验方法相似, 但需将 LB 培养基调整为 YPD 培养基。

1.2.7 SP@COS2、COS2 对生物被膜细胞形态的影响

取活化后的白色念珠菌菌液, 以 PBS 洗涤后, YPD 液体培养基复溶, 并调整菌浓度为 10⁷ CFU/mL, 24 孔超分辨共聚焦显微镜板中每孔分别加入 500 μL 菌液, 37 °C 培养 24 h; 吸出菌液, PBS 清洗 3 次, 再分别加入 500 μL 不同样品溶液, 光照培养 24 h; 吸出样品溶液, PBS 清洗 3 次, 加入 4% 的多聚甲醛固定液 500 μL 于室温下固定 30 min, PBS 清洗 3 次, 加入 5 μg/mL 的荧光增白剂 28 各 200 μL, 30 °C 避光染色 1 h, 染色后, PBS 清洗 3 次; 于超分辨共聚焦显微镜下进行拍照观察生物被膜细胞形态的变化。

1.3 数据分析

所有试验均重复 3 次。采用 GraphPad Prism 9 软件分析所有数据。以 *t* 检验评价 2 组之间的显著性差异, 以单因素方差分析评价 3 个或 3 个以上比较组之间的显著性差异, 所有数据以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 高抑菌活性壳寡糖的筛选

实验中涉及的壳寡糖结构特征详见表1。研究指出,不同结构的壳寡糖具有不同的生物活性^[28],正如图2A、2B所示,4种壳寡糖中仅COS2对浮游态的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌表现出显著抑制效果。如图2C、2D和表2所示,COS2对

大肠杆菌的半数抑菌浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})值为0.2 mg/mL,最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和最小杀菌浓度(minimum bactericidal concentration, MBC)均为5 mg/mL;对于金黄色葡萄球菌,COS2的 IC_{50} 值为0.01 mg/mL, MIC值为2 mg/mL, MBC值为5 mg/mL。值得注意的是,COS2对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的抑菌浓度并不相同(表2)。

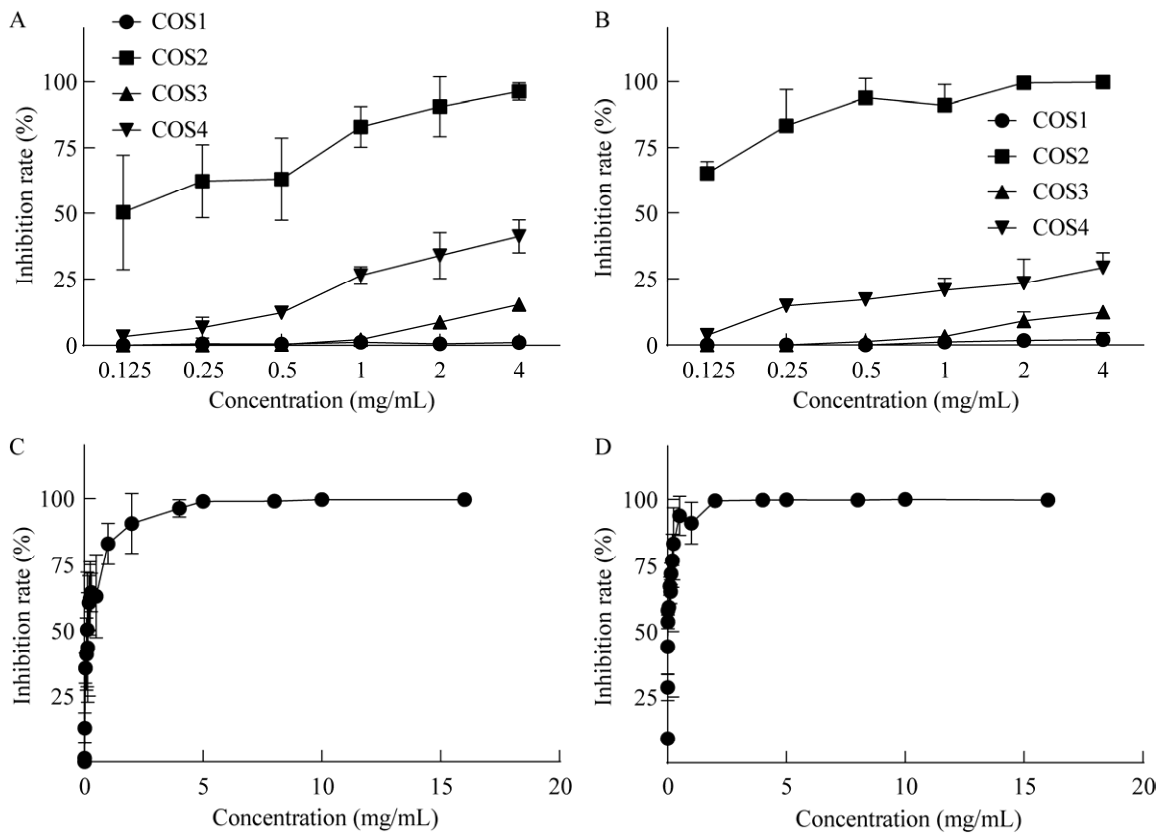


图2 抑菌曲线图 4种壳寡糖对大肠杆菌(A)和金黄色葡萄球菌(B)浮游菌的抑制效果比较. COS2对大肠杆菌(C)和金黄色葡萄球菌(D)浮游菌的浓度-抑菌曲线

Figure 2 Antibacterial curve. Comparison of the inhibitory effects of four chitooligosaccharides on *Escherichia coli* (A) and *Staphylococcus aureus* (B). The concentration-inhibition curve of COS2 against *E. coli* (C) and *S. aureus* (D).

表2 COS2的 IC_{50} 、MIC和MBC

Table 2 IC_{50} , MIC and MBC of COS2

Unit (mg/mL)	<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	IC_{50}	MIC	MBC	IC_{50}	MIC	MBC
COS2	0.2	5	5	0.01	2	5

2.2 螺旋藻的生长状况监测

按照 2.2.3 的方法培养螺旋藻, 如图 3A 所示, 螺旋藻藻种在锥形瓶中培养生长, 传代初期, 溶液颜色较浅, 且仅有少量气泡, 随着螺旋藻的生长, 溶液逐渐由浅黄绿色变为墨绿色, 并且随着光合作用的进行, 溶液上层产生丰富气泡。图 3B 的超分辨共聚焦显微镜图像展示出螺旋藻的细节结构, 整体藻丝呈现螺旋弯曲结构, 且细胞间也呈现出一节一节的弯曲螺旋缠绕状。

在 0、24、72 h 观测其明场和荧光场的图像, 如图 3C 所示, 随着培养时间的延长, 螺旋藻的数量逐渐增加, 且存在相互聚集的趋势, 符合其光能自养型生物的特性。螺旋藻的生长曲线如图 3D 所示, 在第 6 天生长达到最旺盛的阶段, 从第 7 天开始生长速率下降, 这可能与培养基的消耗及环境 pH 的变化有关。液体螺旋藻吸光度值与螺旋藻干物质的量浓度的关系如图 3E 所示, 螺旋藻的液体定量有利于后续实验的进行。

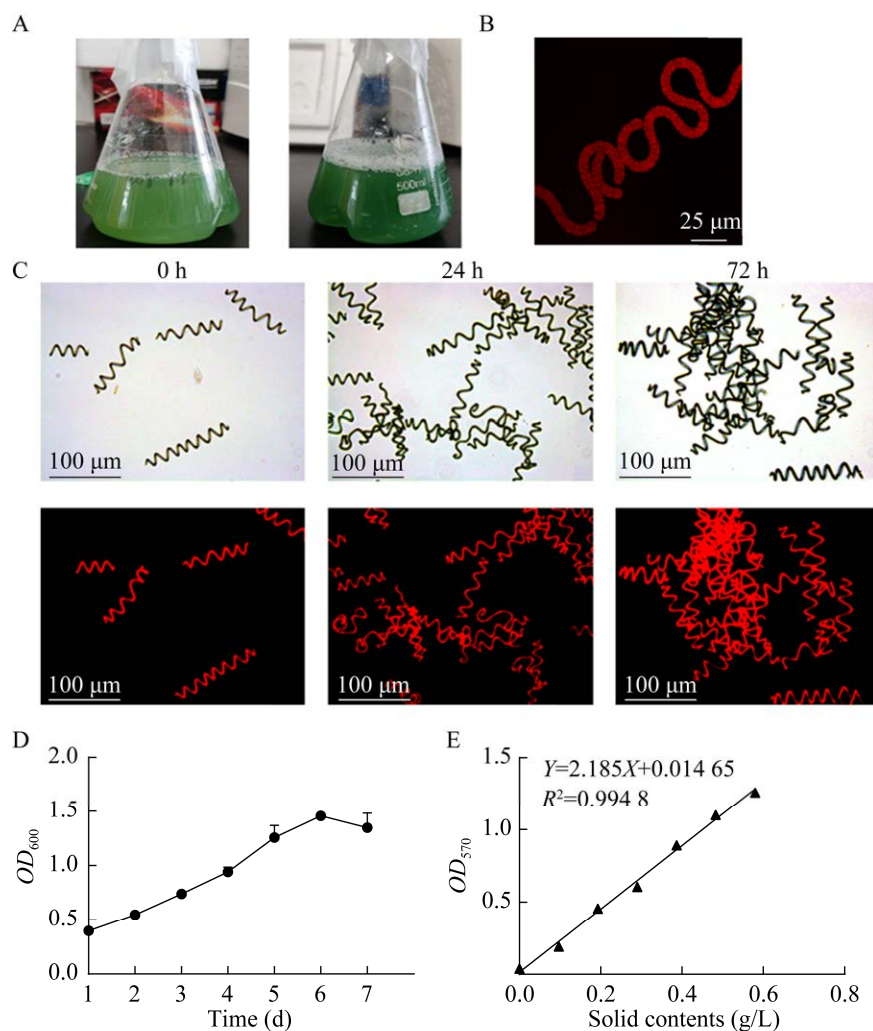


图 3 螺旋藻的生长监测 A: 螺旋藻传代初始和传代 72 h 后的液体溶液状态. B: 螺旋藻的超分辨共聚焦显微镜图像, 标尺大小为 25 μm . C: 螺旋藻 0、24、72 h 的荧光倒置显微镜明场、荧光场图像, 标尺大小为 100 μm . D: 螺旋藻的生长曲线. E: 螺旋藻的液体定量曲线

Figure 3 Monitoring the growth of *Spirulina*. A: The culture broth state of *Spirulina* subcultured for 0 and 72 h. B: Super-resolution confocal microscopy images of *Spirulina*. C: Fluorescence microscope image of *Spirulina* at 0, 24 h, and 72 h. Bar=100 μm . D: Growth curve. E: Standard curve.

2.3 SP@COS2 复合物的表征

2.3.1 动态光散射粒度仪分析

按照 2.2.4 的方法得到 SP@COS2 复合物后, 基于粒径变化对螺旋藻和 COS2 的结合情况进行分析。图 4A 的粒径测量结果表明, 螺旋藻的平均粒径约为 1.8 μm , COS2 的粒径约为 1 μm , 随着 COS2 浓度的增加, SP@COS2 的粒径增加到 3 μm , 且螺旋藻和 SP@COS2 的粒径大小存在显著差异($P<0.01$), 初步确定 SP 和 COS2 有效结合。进一步通过测定 zeta 电位变化情况确定这 2 种物质是否通过正负电荷相结合。如图 4B 所示, 螺旋藻的 zeta 电位为 -28.4 mV, COS2 的 zeta 电位约为 40 mV, 而 SP@COS2 的 zeta 电位介于两者之间, 且随着 COS2 浓度的增加, 电荷越接近中性。上述结果说明两者可能通过静电相互作用而结合。

2.3.2 荧光染色及超分辨激光共聚焦显微镜分析

由于螺旋藻可自行发出红色荧光, 所以对 COS2 进行了荧光素的标记或识别, 以期通过超分辨激光共聚焦显微镜观察两者的结合状况。

异硫氰酸荧光素(FITC)的异硫氰酸酯基团可以与壳寡糖的氨基相连, 从而使 COS2 显出绿色荧光。因此制备了 COS2-FITC 衍生物, 用于观察其与螺旋藻的结合情况。如图 5A 所示, 在螺旋藻单独存在的情况下, 488 nm 通道上只有微弱的绿色荧光, SP@COS2-FITC 则显示出强烈的绿色荧光, 图 5A 中的细节图更加明显地展示了螺旋藻和 COS2-FITC 的结合情况, 壳寡糖颗粒均匀地附着在螺旋藻螺旋结构的表面。荧光定量结果(图 5D)显示 SP@COS2-FITC 的荧光强度为 68%, 而螺旋藻的荧光强度为 36%, 存在显著差异($P<0.001$)。

FITC 标记的麦胚凝集素(WGA-FITC)的糖受体是 N-乙酰葡萄糖胺, 常被用来识别几丁质和肽聚糖, 因此, 将 WGA-FITC 用于壳寡糖识别, 观察 COS2 在聚合物中的分布情况。如图 5B、E 所示, SP@COS2 在绿色荧光通道中的荧光强度为 70%, 明显高于螺旋藻(37%), 且均匀分布在螺旋结构内部。1 mg/mL 和 10 mg/mL 的 WGA-FITC 处理后的 SP@COS2 的平均荧光强度无显著性差异, 表明 COS2 与螺旋藻的结合

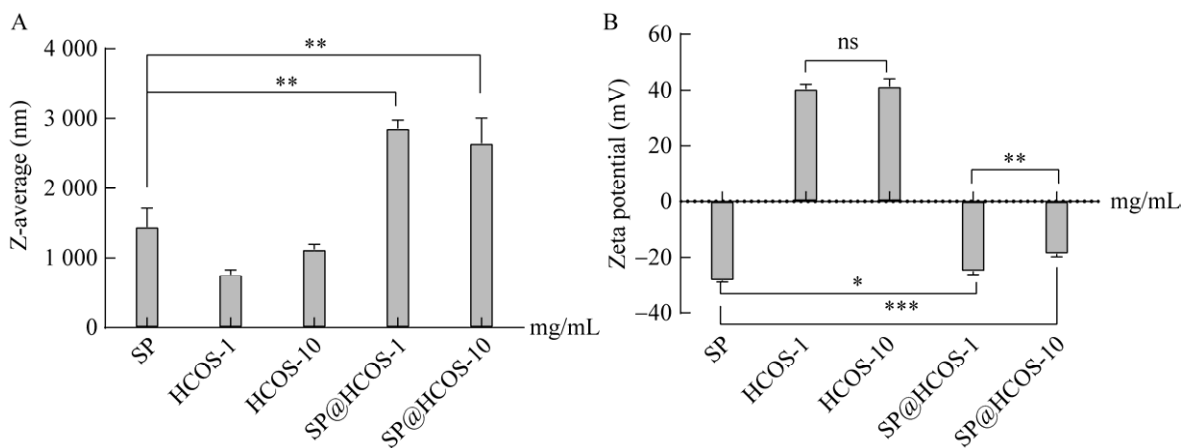


图 4 螺旋藻、COS2、SP@COS2 的粒径结果(A)和 zeta 电位结果(B) * : $P<0.05$; ** : $P<0.01$; *** : $P<0.001$; ns: 无显著差异

Figure 4 Z-average (A) and zeta potential (B) of *Spirulina*, COS2, and SP@COS2. * : $P<0.05$; ** : $P<0.01$; *** : $P<0.001$, ns: No significant difference.

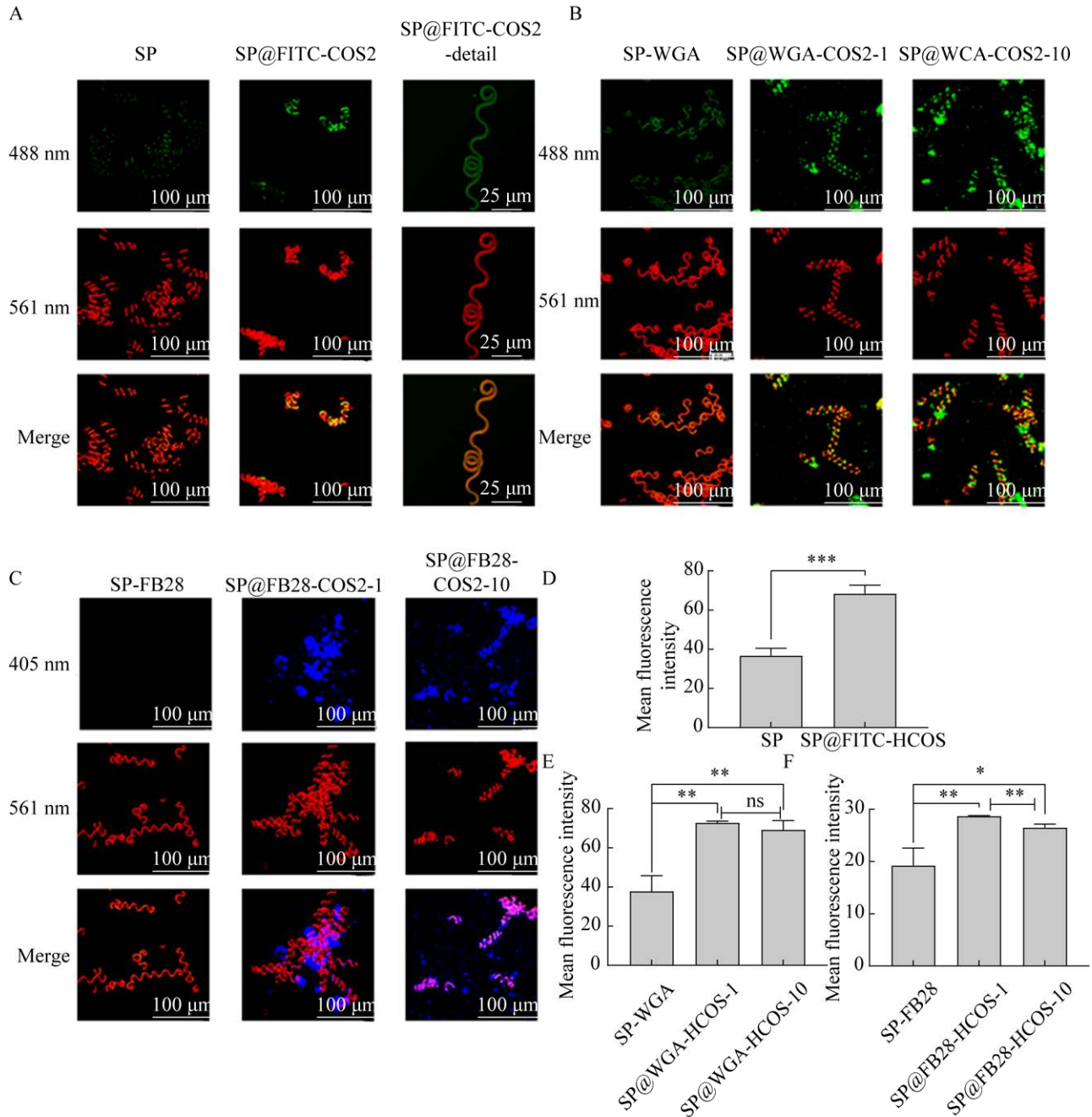


图5 超分辨率共聚焦显微镜图像 A: COS2-FITC与螺旋藻结合. B: FITC-WGA识别COS2. C: FB28识别COS2前后超分辨共聚焦显微镜图像,除细节图组标尺大小为25 μ m,其余图像标尺大小均为100 μ m. D: COS2-FITC与螺旋藻结合. E: FITC-WGA识别COS2. F: FB28识别COS2前后的平均荧光强度. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: 无显著差异.

Figure 5 Super-resolution confocal microscopy images. A: COS2-FITC binding to *Spirulina*. B: FITC-WGA recognizes COS2. C: FB28 recognizes of COS2. Average fluorescence intensity of D: COS2-FITC binding to *Spirulina*. E: FITC-WGA recognizes COS2. F: FB28 recognizes of COS2. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ns: No significant difference.

在 1 mg/mL 时接近饱和。由于螺旋藻本身具有绿色荧光, 进一步选择了荧光增白剂 28 (FB28) 对 COS2 进行识别。FB28 能够非特异性结合 β -1,3-连接或 β -1,4-连接的聚糖并发出蓝色荧光, 因此可用于壳寡糖识别。如图 5C、5F 所示, FB28 的识别结果与 FITC-WGA 相似。螺旋藻单独存在时, 405 nm 通道上无荧光, 而 FB28 处理后的 SP@COS2 在 405 nm 通道上有明显的蓝色荧光。根据 561 nm 通道图像, COS2 主要集中在螺旋藻存在的地方, 并呈现螺旋结构。共聚焦显微镜结果显示 COS2 覆盖螺旋藻表面并均匀结合。

2.3.3 UV-Vis 分析

通过以上方法, 确定了螺旋藻可以与 COS2 有效结合, 其结合可能通过静电相互作用实现。进一步通过紫外可见光谱法(UV-Vis)分析了螺旋藻与 COS2 的结合情况。首先, 对 SP@COS2-FITC 复合物溶液离心, 将螺旋藻-壳寡糖复合物与游离的壳寡糖分离。分析了不同浓度的 COS2-FITC 溶液和 SP@COS2-FITC 离心后的上清液的 UV-Vis 光谱。如图 6A、6B 所示, COS2-FITC 的吸光度值在 400–600 nm 区域内变化明显, 在 490 nm 附近达到最大值。随着 COS2-FITC 浓度的增加, 吸光度值的变化更加显著。而 SP@COS2-FITC 复合物离心后上清液在 400–600 nm 区域的吸光度值无明显波动, 这说明 COS2 与螺旋藻结合后富集在沉淀中, 上清液中只有少量未结合的 COS2-FITC。根据不同浓度的 COS2-FITC 在 490 nm 处的最大吸收值制作 FITC-COS2 的标准曲线, 结果如图 6C 所示。根据标准曲线和上清液在 490 nm 处的吸光度计算 SP@COS2-FITC 中 COS2 的含量, 再根据 2.6.4 中的公式计算载药率(DLE)和包封率(EE)。如图 6D、6E 所示, 载药率和包封率随着壳寡糖浓度的增加而增加, 当壳寡糖浓度为

0.25 mg/mL 以上时, 包封率达 90%以上。1 mg/mL 壳寡糖与螺旋藻孵育后, 载药率可达 16.2%, 包封率可达 96.48%。

2.4 SP@COS2 对生物被膜的抑制效果评价

如前所述, 成功制备并表征了 SP@COS2。接下来评估了 SP@COS2 对生物被膜的抑制作用。首先对细菌生物被膜的活性进行了测定, 如图 7A、7B 所示, 无论是革兰氏阳性菌还是革兰氏阴性菌, SP@COS2 均比 COS2 具有更显著的抑制效果($P < 0.000 1$)。研究发现, 2.5 mg/mL 的 COS2 对大肠杆菌生物被膜有近 10%的抑制作用, 1.25 mg/mL 的 COS2 对金黄色葡萄球菌生物被膜有近 10%的抑制作用, 但 SP@COS2 在 0.312 5 mg/mL 浓度时就有抑制作用, 此时对大肠杆菌抑制率为 10%, 对金黄色葡萄球菌为 50%。5 mg/mL 的 COS2 对大肠杆菌生物被膜的抑制率仅为 15%左右, 而 SP@COS2 的抑制率可达到 60%以上, 该浓度的 COS2 对金黄色葡萄球菌的生物被膜抑制率为 60%, SP@COS2 的抑制率为 80%。此外, 还测定了螺旋藻对于大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生物被膜的抑制效果, 发现仅螺旋藻单独作用时, 抑制率均为 25%左右, 而与 COS2 形成复合物后, 随着 COS2 的浓度增加, SP@COS2 复合物对于生物被膜的抑制率显著增加。

测定了不同浓度的 SP@COS2 对白色念珠菌浮游态和生物被膜态的抑制作用, 结果如图 7C 所示, 0.312 5 mg/mL 的 COS2 对浮游态白色念珠菌的抑制率近 80%, SP@COS2 的抑制率为 99%, 有显著的抑制增效作用($P < 0.05$), 但 0.312 5 mg/mL 以上 COS2 对浮游态白色念珠菌的抑制率已经为 90%, 而螺旋藻单独作用时抑制率也有近 35%, 所以增效并不明显。如图 7D 所示, 同浓度的 SP@COS2 对白色念珠菌生物被膜的抑制作用明显高于单独作用的螺旋藻和 COS2 ($P < 0.001$), 说明 SP@COS2 复合物对生物被膜的抑制具有协同增

效作用。当 COS2 浓度为 0.312 5 mg/mL 时, 对白色念珠菌生物被膜的抑制率仅为 50%左右, 但 0.312 5 mg/mL 的 SP@COS2 对白色念珠菌的抑制率超过 70%, 当 COS2 浓度为 5 mg/mL 时, 对白

色念珠菌生物被膜的抑制率为 90%左右, 同浓度的 SP@COS2 抑制率可达 99%以上。综上所述, SP@COS2 复合物对于增强壳寡糖抑制生物被膜的效果至关重要。

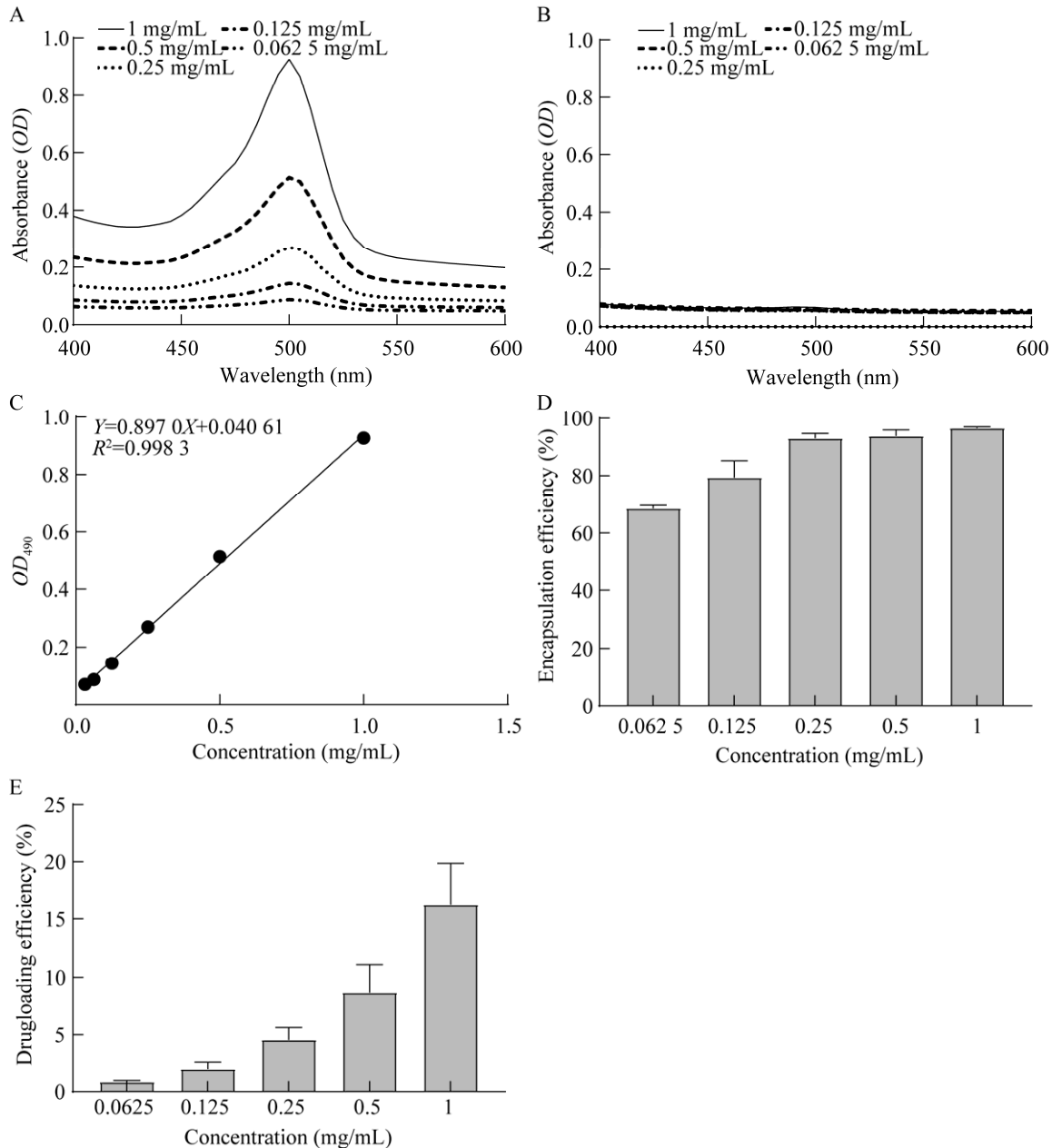


图 6 UV-Vis 光谱分析 不同浓度 COS2-FITC (A)和 SP@COS2-FITC (B)离心后上清液的 UV-Vis 光谱图. C: COS2-FITC 的标准曲线. SP@COS2-FITC 的包封率(D)和载药率(E)

Figure 6 UV-Vis analysis. UV-Vis spectra of COS2-FITC (A) and SP@COS2-FITC (B). C: The standard curve of COS2-FITC. Encapsulation efficiency (D) and drug loading efficiency (E) of SP@COS2-FITC.

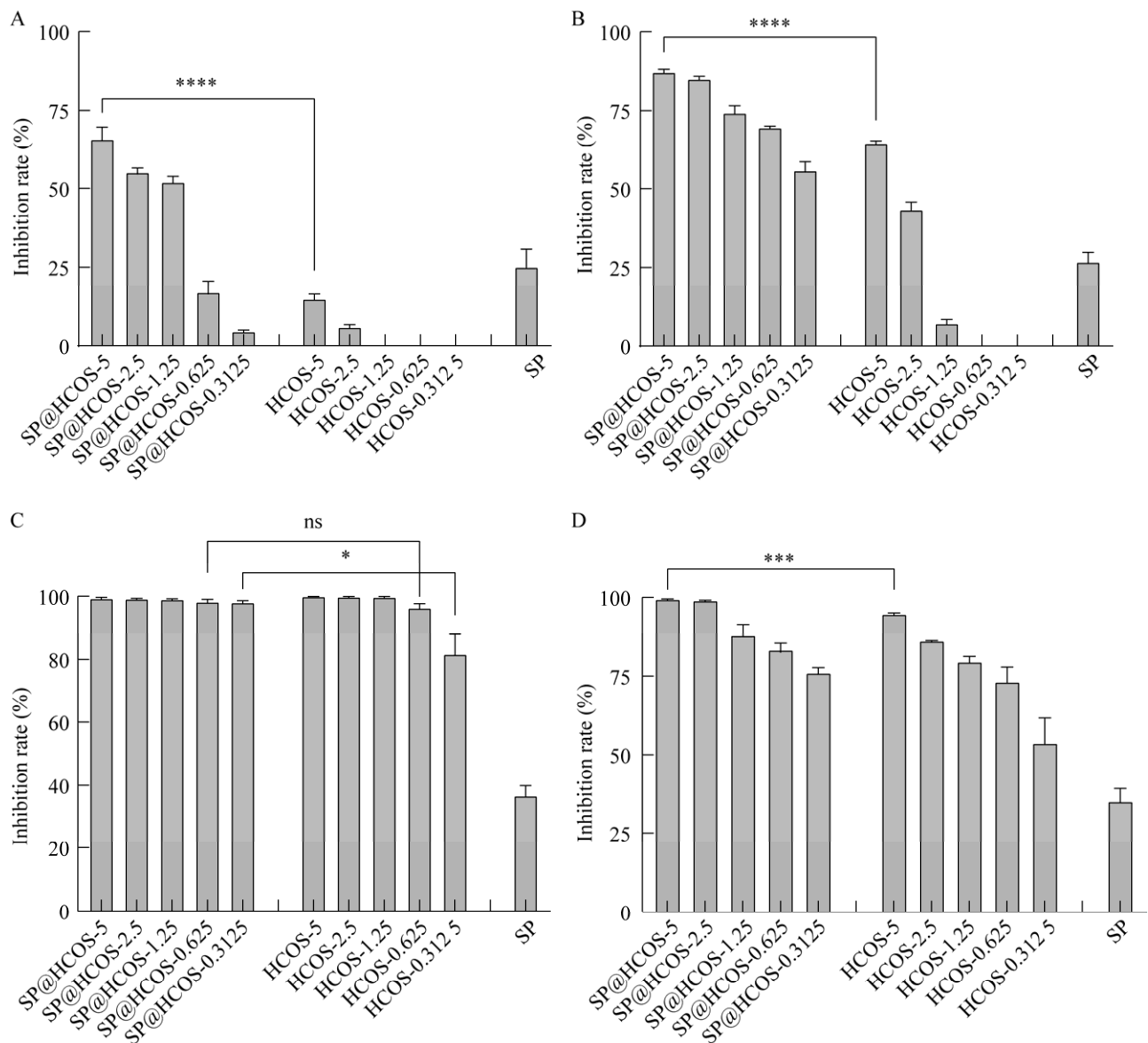


图7 不同浓度的 SP@COS2、COS2 对不同生物被膜的抑制率 A: 大肠杆菌生物被膜. B: 金黄色葡萄球菌生物被膜. C: 白色念珠菌浮游菌. D: 白色念珠菌生物被膜. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns: 无显著差异

Figure 7 Inhibition rate of different concentrations of SP@COS2 and COS2 on different biofilms. A: *Escherichia coli* biofilm. B: *Staphylococcus aureus* biofilm. C: *Candida albicans* planktonic bacteria. D: *Candida albicans* biofilm. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$, ns: No significant difference.

2.5 SP@COS2、COS2 对白色念珠菌生物被膜的形态影响

进一步探究了 SP@COS2 复合物处理生物被膜前后, 细胞形态与结构的变化, 同时与单

独使用 COS2 抑制进行了对比。如图 8A 所示, 在白色念珠菌生物被膜形成后, 再用 5 mg/mL 的 SP@COS2 复合物处理 24 h, 洗去复合物, 经多聚甲醛固定后, 用荧光增白剂 28 对

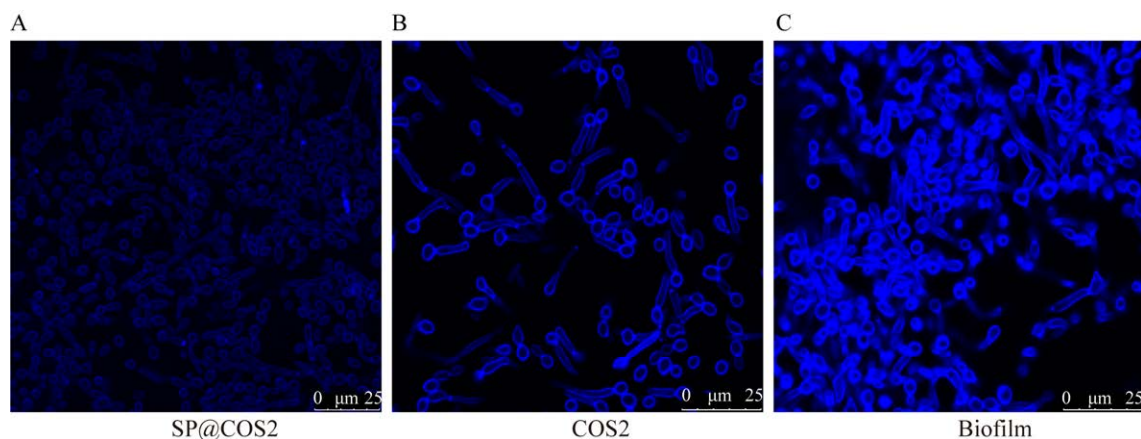


图 8 白色念珠菌生物被膜细胞形态变化 A: SP@COS2 处理. B: COS2 处理. C: 白色念珠菌生物被膜原始状态

Figure 8 Morphological changes of *Candida albicans* biofilm. A: SP@COS2 treatment group. B: COS2 treatment group. C: *Candida albicans* normal biofilm.

白色念珠菌表面进行染色, 结果发现白色念珠菌大多处于生物被膜形成的早期形态, 即芽生孢子时期, 多为圆形酵母态细胞, 细胞数量较少且分散, 荧光强度较弱, 这可能是复合物抑制了生物被膜及菌丝的形成。图 8B 显示仅用 5 mg/mL 的 COS2 处理后, 白色念珠菌由酵母态分化为菌丝态数量更多, 但细胞数量仍然较少, 说明壳寡糖可以抑制白色念珠菌细胞增殖。未做处理的白色念珠菌生物被膜经荧光增白剂 28 染色后结果如图 8C 所示, 生物被膜处于成熟生长期, 细胞形态大多为菌丝或假菌丝态, 细胞间相互聚集, 数量多且密。但图 8 未能显示出 SP@COS2 和 COS2 作用生物被膜位置的区别。

综上所述, SP@COS2 复合物对于细菌和真菌生物被膜均有比 COS2 更加显著的抑制效果, 复合物的增效作用在于螺旋藻和壳寡糖通过静电相互作用结合后, 螺旋藻携带壳寡糖进入生物被膜深处, 释放壳寡糖发挥抑菌作用的同时, 螺旋藻由于光照激发释放活性氧, 2 种抑制作用叠加, 使得生物被膜内部的细菌和真菌细胞生长受到抑制, 细胞形态遭

到破坏, 无法分泌胞外物质以维持正常的生物被膜结构。该复合物的形成解决了壳寡糖只能覆盖在生物被膜表面, 难以进入内部发挥抑菌作用的问题, 拓宽了壳寡糖抑菌作用范围。

3 讨论与结论

壳寡糖对浮游细菌和真菌都具有优异的抗菌效果, 但对生物被膜的作用有限。螺旋藻作为一种表面带有负电荷的螺旋状自养微藻, 具有安全无毒、自发荧光和易附着在宿主表面等优点。通过静电吸附法制备了 SP@COS2 复合物, 并通过多种方法对螺旋藻和 COS2 的结合进行了表征。通过活菌计数法发现 SP@COS2 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的生物被膜均有明显的抑制增效作用, 且通过细胞染色和超分辨共聚焦显微镜观察阐述了 SP@COS2 复合物发挥作用的机理。壳寡糖和螺旋藻作为新食品原料, 天然无毒害, 本实验结果拓宽了壳寡糖的应用场景, 为开发天然生物被膜抑制剂提供了新的思路与理论基础。

REFERENCES

- [1] GUO SW, HUANG QX, CHEN Y, WEI JW, ZHENG J, WANG LY, WANG YT, WANG RB. Frontispiece: synthesis and bioactivity of guanidinium-functionalized pillar[5]arene as a biofilm disruptor[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(2): 618-623.
- [2] CHEN L, WEN YM. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies[J]. *International Journal of Oral Science*, 2011, 3(2): 66-73.
- [3] TIAN FJ, LI J, NAZIR A, TONG YG. Bacteriophage-a promising alternative measure for bacterial biofilm control[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2021, 14: 205-217.
- [4] JAMAL M, AHMAD W, ANDLEEB S, JALIL F, IMRAN M, NAWAZ MA, HUSSAIN T, ALI M, RAFIQ M, KAMIL MA. Bacterial biofilm and associated infections[J]. *Journal of the Chinese Medical Association*, 2018, 81(1): 7-11.
- [5] VISHWAKARMA A, DANG F, FERRELL A, BARTON H, JOY A. Peptidomimetic polyurethanes disrupt surface established bacterial biofilms and prevent biofilm formation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2021, 143(25): 9440-9449.
- [6] LEVY SB, MARSHALL B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses[J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(S12): S122-S129.
- [7] BELLANGER X, GUILLOTEAU H, BONOT S, MERLIN C. Demonstrating plasmid-based horizontal gene transfer in complex environmental matrices: a practical approach for a critical review[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 493: 872-882.
- [8] DA SSC, FERNANDES IP, BARROS L, FERNANDES Â, JOSÉ AM, CALHELHA RC, PEREIRA C, BARREIRA JCM, MANRIQUE Y, COLLA E, FERREIRA ICFR, FILOMENA BM. Spray-dried *Spirulina platensis* as an effective ingredient to improve yogurt formulations: testing different encapsulating solutions[J]. *Journal of Functional Foods*, 2019, 60: 103427.
- [9] BASHIR S, SHARIF MK, JAVED MS, AMJAD A, AHMAD KA, SHAH FUH, AHMAD KA. Safety assessment of *Spirulina platensis* through sprague dawley rats modeling[J]. *Food Science and Technology (Campinas)*, 2020, 40(2): 376-381.
- [10] DENG RT, CHOW TJ. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*[J]. *Cardiovascular Therapeutics*, 2010, 28(4): e33-e45.
- [11] SONI RA, SUDHAKAR K, RANA RS. *Spirulina*-from growth to nutritional product: a review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 69: 157-171.
- [12] MAO RX, GUO SS. Performance of the mixed LED light quality on the growth and energy efficiency of *Arthrospira platensis*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(12): 5245-5254.
- [13] ZHONG DN, ZHANG DX, CHEN W, HE J, REN CJ, ZHANG XC, KONG N, TAO W, ZHOU M. Orally deliverable strategy based on microalgal biomass for intestinal disease treatment[J]. *Science Advances*, 2021, 7(48): e9265.
- [14] LODHI G, KIM YS, HWANG JW, KIM SK, JEON YJ, JE JY, AHN CB, MOON SH, JEON BT, PARK PJ. Chitooligosaccharide and its derivatives: preparation and biological applications[J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 1-13.
- [15] SUN T, QIN YY, XU HL, XIE J, HU DM, XUE B, HUA XY. Antibacterial activities and preservative effect of chitosan oligosaccharide Maillard reaction products on *Penaeus vannamei*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 105: 764-768.
- [16] CHANG SH, CHEN CH, TSAI GJ. Effects of chitosan on *Clostridium perfringens* and application in the preservation of pork sausage[J]. *Marine Drugs*, 2020, 18(2): 70.
- [17] SINGH P. Effect of chitosans and chitooligosaccharides on the processing and storage quality of foods of animal and aquatic origin[J]. *Nutrition & Food Science*, 2016, 46(1): 51-81.
- [18] XIA WS, LIU P, ZHANG JL, CHEN J. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides[J]. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25(2): 170-179.
- [19] ZHONG DN, ZHANG DX, XIE TT, ZHOU M. Biodegradable microalgae-based carriers for targeted delivery and imaging-guided therapy toward lung metastasis of breast cancer[J]. *Small*, 2020, 16(20): 2000819.
- [20] HAN Y, KONG L, LI G. Inhibitory effect of D-penicillamine stabilized silver cluster on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2022, 38(3): 320-324.
- [21] SIM JY, KIM S, LEE J, LIM H, KIM HH, PARK ZY, KIM JI. A significantly enhanced antibacterial spectrum of D-enantiomeric lipopeptide bactenecin[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 514(2): 497-502.

- [22] CARDOSO LG, DUARTE JH, ANDRADE BB, LEMOS PVF, COSTA JAV, DRUZIAN JL, CHINALIA FA. *Spirulina* sp. LEB 18 cultivation in outdoor pilot scale using aquaculture wastewater: high biomass, carotenoid, lipid and carbohydrate production[J]. *Aquaculture*, 2020, 525: 735272.
- [23] LI YQ, CHEN QX, SHI WQ, XIONG ZY, LI SD, LI GR, LING XW. The effect of light on the growth rate of *Spirulina*[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2014, 1(10): 51-51.
- [24] LI RL, ZHU LM, LIU DD, WANG WJ, ZHANG C, JIAO SM, WEI JH, REN LS, ZHANG YC, GOU X, YUAN XH, DU YG, WANG ZA. High molecular weight chitosan oligosaccharide exhibited antifungal activity by misleading cell wall organization *via* targeting PHR transglucosidases[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2022, 285: 119253.
- [25] WANG YJ, WEN R, LIU DD, ZHANG C, WANG ZA, DU YG. Exploring effects of chitosan oligosaccharides on the DSS-induced intestinal barrier impairment *in vitro* and *in vivo*[J]. *Molecules*, 2021, 26(8): 2199.
- [26] FLAVEN PJ, MOUSSIAN B. Fluorescent microscopy-based detection of chitin in intact *Drosophila melanogaster*[J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 856369.
- [27] KHOT PD, SUCI PA, TYLER BJ. *Candida albicans* viability after exposure to amphotericin B: assessment using metabolic assays and colony forming units[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2008, 72(3): 268-274.
- [28] GUAN GP, AZAD MAK, LIN YS, KIM SW, TIAN Y, LIU G, WANG HB. Biological effects and applications of chitosan and chito-oligosaccharides[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 516.

(本文责编 郝丽芳)