

材料表面浸润性对细菌粘附的影响

张薇, 陆乃彦, 陈晓霞, 周鹏*

(食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122)

摘要: 材料表面的细菌粘附常引起食品腐败或植入性感染, 有时甚至会引发疾病, 而控制细菌在材料表面的初始粘附能够减少这些安全隐患。作者通过化学接枝的方法, 制备了不同表面浸润性的材料, 并与大肠杆菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌等 3 种常见致病菌共同培养, 系统地研究了材料表面浸润性对细菌粘附的影响。研究表明, 随着材料表面疏水性的增加, 其抗细菌粘附能力显著提升。另外, 表面带负电材料的抗菌能力更强。这些结果能够帮助理解细菌在材料表面粘附的内在机理, 同时有助于抗菌材料的设计和制备。

关键词: 表面接枝; 表面浸润性; 抑制细菌粘附; 生物膜

中图分类号: TS 206.1 文章编号: 1673-1689(2019)03-0026-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.03.004

Effect of Different Surface Wettability on Bacteria Adhesion

ZHANG Wei, LU Naiyan, CHEN Xiaoxia, ZHOU Peng*

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Bacteria adhesion on surfaces often causes implanted infections, food spoilage and human illness. The control of the initial adhesion to materials is very important to avoid safety and health problems. In this study, materials with different surface wettability were fabricated via chemical grafting. Three model strains (*Escherichia coli* BL21, *Staphylococcus aureus* 6538 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) were imported to demonstrate the influence of surface wettability markedly. Besides, surfaces with negative charge were more resistant to bacterial adhesion. The results of this study provided new insights into the mechanism of bacteria adhesion, and could be effectively used in designing of anti-bacterial materials.

Keywords: chemical grafting, surface wettability, bacteria adhesion inhibition, biofilm

生物膜是微生物为了适应胁迫环境而形成的有利于其生存的特殊生长状态, 是由其自身分泌胞外粘质物包裹的、具有高度组织化的多细胞群体结

构。生物膜的形成常出现在食品制造、医疗植入等领域中, 导致食品污染、病菌感染等严重问题。在食品加工过程中, 病原体生物膜的形成, 是食品传播

收稿日期: 2016-01-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401589); 食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题(SKLF-ZZA-201507); 高等学校学科创新引智计划(111 Project-B07029)。

* 通讯作者: 周鹏(1975—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品物性、乳制品与水产品加工方面的研究。

E-mail: zhoupeng@jiangnan.edu.cn

引用本文: 张薇, 陆乃彦, 陈晓霞, 等. 材料表面浸润性对细菌粘附的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(03): 26-31.

类疾病的主要成因。在美国,此类疾病每年引起数千人死亡,造成780多亿美元的经济损失^[1]。因此,抑制生物膜形成对于预防微生物污染具有十分重要的意义。

生物膜的形成分为5个阶段,可逆接触阶段、不可逆接触阶段、菌落形成阶段、生物膜成熟阶段以及生物膜老化脱落阶段^[2],其中,细菌粘附是生物膜形成的第一步。成熟的生物膜对紫外光等多种常规处理方式具有抵抗作用^[3],因此,抑制细菌粘附在生物膜形成的早期对其进行控制是十分重要的。

影响细菌粘附情况的因素主要包括材料的表面电荷、表面化学组成、表面粗糙度、表面浸润性、材料刚性等^[4],这些材料的性质以及细菌本身的性质决定了细菌与表面的相互作用情况。由于细菌与材料的相互作用体系较为复杂,目前尚未有完善的理论模型来解释各因素在细菌粘附过程中的作用,因此,亟需系统地研究材料的各性质对细菌粘附情况的影响趋势,以及细菌对不同环境所产生的响应情况。其中,对材料表面浸润性这一影响因素的研究结果存在一定争议,许多研究者认为,疏水材料表面对细菌的抗粘附性更强^[5-6],但也有部分研究结果表面,亲水性的表面更有利于抗细菌粘附^[7-9]。这些相悖的结论可能是由于实验环境的复杂性以及材料、细菌表面物理化学性质的差异等因素造成的。因此,深入分析材料表面浸润性对其抗细菌粘附能力的影响有助于人们理解两者复杂的相互作用机理。

作者通过化学接枝的方法,制备了不同浸润性的十八硫醇/半胱胺、十八硫醇/巯基丙酸混合单分子层表面材料,系统地研究了材料表面浸润性对其抗细菌粘附能力的影响,并通过对比3株食品中常见的有害菌株:大肠杆菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌的粘附实验结果对比,发现随着材料表面疏水性的增加,其抗细菌粘附的能力显著提升。另外,材料表面的电性也对其抗细菌粘附的能力有影响,表面带负电材料的抗菌性明显优于表面带正电的材料。这些研究结果有助于为食品体系中抑制细菌粘附材料的设计和制备提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

大肠杆菌(*Escherichia coli* BL21)、铜绿假单胞

菌(*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027)及金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 6538):购买于美国ATCC菌种库;十八硫醇、半胱胺、3-巯基丙酸、FITC荧光染料:由Sigma公司提供;蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、大豆蛋白胨、葡萄糖、硫酸镁、氯化钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠及无水乙醇:分析纯,购于上海国药集团;激光共聚焦专用玻底培养皿D35C4-20-1-N:杭州生友生物技术有限公司。

CLSM710激光共聚焦显微镜:德国蔡司公司;原子力显微镜Bruker Dimension ICON:德国布鲁克科技有限公司;K550X全自动磁控离子溅射仪:英国Emitech公司;光学接触角测量仪DSA100:德国Krüss GmbH公司;UV-1800紫外可见分光光度计:日本岛津企业管理有限公司;超净工作台:上海智城分析仪器制造有限公司;GI-36全自动立式杀菌锅:厦门致微仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 不同表面疏水性材料的制备 将单抛硅片裁成1 cm×0.5 cm大小,放入浓硫酸:双氧水体积比为3:1的溶液中,加热至90℃保持2 h,以除去硅片表面的有机物,随后用超纯水冲洗,并用氮气吹干。将硅片放入真空镀膜仪,调节真空度为 1×10^{-1} mbar,在45 mA工作电流下,喷金2 min,在硅片表面得到厚度为70 nm的金薄膜。

分别配置浓度2 mmol/L十八硫醇、10 mmol/L半胱胺的乙醇溶液,首先将表面镀金的硅片放入半胱胺溶液中接枝,接枝时间分别为5、10、30、60 min,随后将硅片取出,用无水乙醇冲洗,除去未接枝的半胱胺,随后放入十八硫醇溶液中继续接枝24 h,将接枝后的镀金硅片在无水乙醇中漂洗两遍后用氮气吹干^[10]。

同样配置10 mmol/L的3-巯基丙酸乙醇溶液,与十八硫醇混合接枝到金表面,操作过程与半胱胺/十八硫醇混合接枝相同。

1.2.2 接枝薄膜的表面形貌表征 利用原子力显微镜对接枝后的样品进行表面形貌表征。采用接触模式(Contact mode),探针型号为SNL-A,扫描速率为0.977 Hz,所采集的图像均经过flattening处理来弥补样品倾斜所造成的偏差。

1.2.3 接枝薄膜的表面浸润性表征 利用光学接触角测量仪对接枝后的材料进行表面浸润性的表

征。在室温下测定样品表面接触角,液滴体积 2 μL ,待水滴在样品表面 15 s 后拍照,利用仪器自带软件进行接触角计算。每个样品表面选取 3 个不同位置分别进行测定,取平均值,得到接触角数据。

1.2.4 细菌粘附实验 大肠杆菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌均保藏于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 甘油管中。用斜面培养基对三株菌进行活化后,分别取两针接种于 LB 肉汤培养基中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 200 r/min 下培养 12 h,使菌体生长达到对数期。 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下离心收集菌体,用 pH 7.4、 0.08 mol/L PBS 缓冲液洗涤两次,用 PBS 调节菌悬液,使其 OD_{600} 为 $(0.6\pm 0.05)\times 10^8\text{ CFU/mL}$ 。接下来,大肠杆菌悬液以 1% 浓度接入 M63 培养基,铜绿假单胞菌悬液、金黄色葡萄球菌悬液以同样的浓度接入 TSB 培养基中,将接枝后的材料置于六孔培养板底部,接入含有菌悬液的新鲜培养基,在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 下培养 5 h。

1.2.5 激光共聚焦样品处理及观察 将培养好的材料取出,于 0.08 mol/L PBS 中漂洗,去除未粘附的菌体。用含 2.5% 戊二醛、2% 多聚甲醛的 PBS 缓冲液固定 15 min,以保存细菌细胞和组织的原有形态结构。将样品在 PBS 缓冲液中漂洗 10 min,置于 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 FITC 溶液中染色 30 min,再用 PBS 缓冲液漂洗两次^[11]。

将处理好的样品反面向上放置于玻底培养皿中,在激光共聚焦荧光显微镜 (LSM710,德国蔡司公司) 下观察。FITC 在 488 nm 激光下激发,用 $40\times$ 物镜获取图像。每个样品随机选取三个不同位置进行观察并拍照,使用 CLSM 自带软件 ZEN 2012 (蔡司,德国) 对数据进行处理,用整张图片的荧光覆盖率表示已粘附细菌的量^[12]。

2 结果与讨论

2.1 接枝后样品的表面性质

十八硫醇、半胱胺及巯基丙酸的分子结构式见图 1。他们的共同基团巯基与样品表面形成 Au-S 键,共价接枝到样品表面。用 AFM 对其形貌进行表征,见图 2。可以看到,接枝材料在样品表面形成一层单分子层,由于分子排斥体积效应^[13-14],接枝材料向上伸展,呈刷状分布,平均高度约 5 nm。通过接触角测量仪对衬底表面的疏水性进行表征,结果见表 1。当半胱胺或巯基丙酸接枝时间较短时,材料表面的接触角在 120° 左右,疏水性较强;随着半胱胺或

巯基丙酸接枝时间的上升,材料表面的氨基/羧基浓度增加,其疏水性逐渐降低至亲水,最终接触角达到 40° 左右。因此,可以通过调整半胱胺或巯基丙酸的接枝时间,得到各种表面浸润性不同的材料。

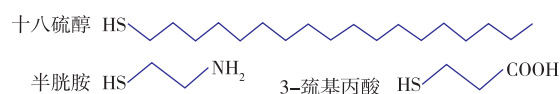


图 1 十八硫醇、半胱胺及 3-巯基丙酸的分子结构式

Fig. 1 Structural formula of the octadecanethiol, cysteamine and 3-mercaptopropionic acid

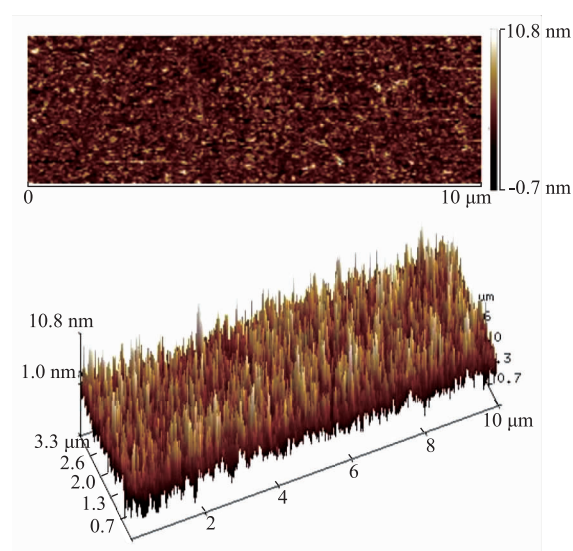


图 2 接枝样品形貌表征

Fig. 2 AFM images of the sample after graft modification

表 1 不同接枝时间所得样品接触角

Table 1 Contact angles on samples with different graft time

样品	接触角/ $^\circ$			
	5 min	10 min	30 min	1 h
十八硫醇/半胱胺	118 ± 3.2	101 ± 2.3	74 ± 2.9	42 ± 1.8
十八硫醇/3-巯基丙酸	122 ± 2.4	88 ± 4.1	62 ± 3.3	33 ± 1.6

2.2 不同表面浸润性材料对细菌粘附情况的影响

2.2.1 十八烷硫醇/半胱胺混合单分子层对细菌粘附情况的影响 作者选取 3 株菌株为食品中常见的有害菌株,也是目前生物膜研究中的典型菌株^[15]。金黄色葡萄球菌常检出于生肉、生乳及速冻食品中。而大肠杆菌是肠道中最普遍、数量最多的一类细菌,也是食品污染程度的重要参数指标。牛奶是常见的易腐败食品之一,控制牛奶腐败的难点之一,即牛奶中金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及沙门氏

菌生物膜的形成。铜绿假单胞菌形成生物膜,在日常食品检测中,铜绿假单胞菌虽然不作为食品微生物检验的常规指标,但其已被确认为食源性和水源性致病菌,易污染熟肉制品、凉拌即食食品,海鲜等食品。

在接触角约为 118° 、 101° 、 74° 、 42° 等表面浸润性梯度变化的样品表面进行细菌粘附实验。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌及铜绿假单胞菌作为细菌模型,其在材料表面的粘附情况见图 3。

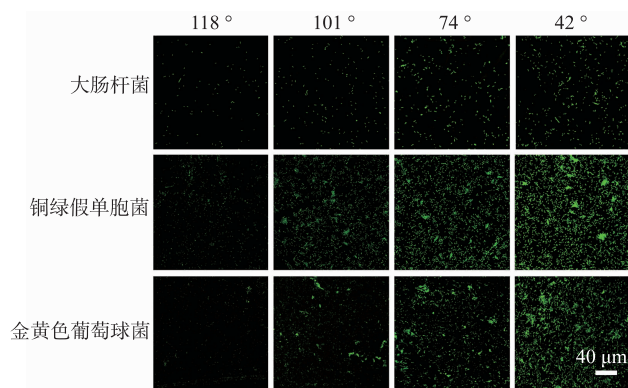


图 3 利用十八硫醇/半胱胺制备的不同接触角样品上大肠杆菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌的粘附情况

Fig. 3 CLSM images of the *E.coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* adhesion on the Octadecanethiol/ cysteamine grafted samples with different contact angles

从图 3 可以看出,当材料表面疏水性较强时,在其表面粘附的 3 种菌较少;随着材料表面疏水性的降低,3 种细菌在其表面的粘附量均逐渐增加,尤其是当材料表面从疏水转变为亲水后,细菌的粘附量与疏水表面相比大为增加。另外,不同细菌在材料表面的粘附量存在一定差异,这主要是由于细菌自身的性质不同所导致的,不同细菌的形状、大小、表面电荷、表面疏水性、鞭毛性质等都存在差异,使得粘附情况更为复杂。作者采用的金黄色葡萄球菌与铜绿假单胞菌由于其尺寸较小,细菌荚膜、粘液、鞭毛等结构完整,比大肠杆菌自聚及粘附能力更强,因此在本实验结果中粘附量更高。然而,即使自身性质存在差异,不同细菌在表面浸润性梯度变化的十八烷硫醇/半胱胺混合膜表面粘附情况变化的趋势是一致的,表明材料表面的浸润性是影响细菌粘附情况的重要因素,材料表面疏水性越强,抗细菌粘附的能力越强。

2.2.2 十八烷硫醇/巯基丙酸混合单分子层对细菌粘附情况的影响 为了进一步验证表面浸润性对细菌粘附情况的影响,我们用带负电性基团-COOH 的巯基丙酸代替带正电性基团-NH₂ 的半胱胺,与十八烷硫醇混合接枝到材料表面。不同表面浸润性的十八烷硫醇/巯基丙酸混合膜对三种细菌的粘附情况影响见图 4。可以看出,随着材料表面浸润性的变化,细菌在其表面的粘附量变化趋势与在十八烷硫醇/半胱胺混合膜表面的变化趋势相同,即随着材料表面疏水性梯度性降低,细菌的粘附量逐渐增加,并且在亲水表面的粘附量远远大于疏水表面。

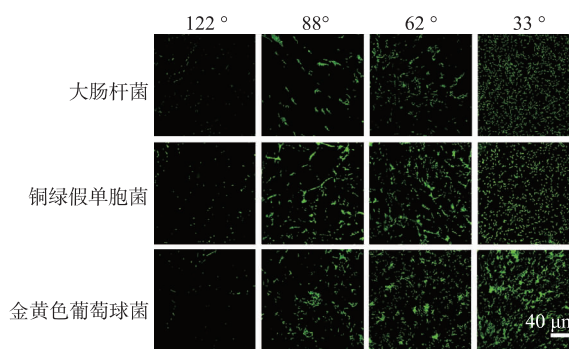


图 4 利用十八硫醇/3-巯基丙酸制备的不同接触角样品上大肠杆菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌的粘附情况

Fig. 4 CLSM images of the *E.coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* adhesion on the on the octadecanethiol/ 3-mercaptopropionic acid grafted samples with different contact angles

材料疏水性作为影响细菌粘附的重要性质,一直是研究细菌粘附的重要考量因素。目前,许多研究团队开展了一系列着重于材料的亲疏水性即浸润性对细菌粘附影响的研究。Arima 和 Iwata^[16]发现细菌能极强的粘附于接触角在 40° ~ 70° 的聚合物表面。但 Lee 等人报道^[17]细菌在 PET(聚对苯二甲酸乙二醇酯)表面极易粘附及生长,尤其当其接触角达到最大值 57° 。此类相反结论的得出也说明关于疏水性对细菌粘附的影响仍有待探索。之后,Ronn^[11]等人发现当材料表面由非湿润状态转变为湿润状态后,细菌粘附能力明显增强。此实验结果也从侧面说明了疏水性强的材料能够更有效的抑制细菌粘附。

2.2.3 材料表面电性对细菌粘附情况的影响 3 种细菌在不同浸润性的十八烷硫醇/半胱胺混合膜或十八烷硫醇/巯基丙酸混合膜表面的覆盖率变化趋势见图 5。从统计结果可以看出,随着表面疏水性的增加,细菌在材料表面的覆盖率下降,并且同一种

细菌在十八烷硫醇/巯基丙酸混合膜表面的粘附量总是小于在十八烷硫醇/半胱胺混合膜表面的粘附量。这两种混合膜的主要区别在于巯基丙酸含有负电性基团-COOH,膜表面带负电,而半胱胺含有正电性基团-NH₂,膜表面带正电。可以推测,细菌在两种混合膜表面粘附情况的差异与其带电性有关。经过测定,大肠杆菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的表面电位分别为(-25.01±2.18) mV、(-16.76±2.24) mV 和(-10.16±3.04) mV,均带负电,其与十八烷硫醇/巯基丙酸混合膜之间存在静电排斥,与带正电的十八烷硫醇/半胱胺混合膜相比,其对细菌的粘附有一定的抑制作用,进一步加强了材料表面对细菌的抗粘附性。

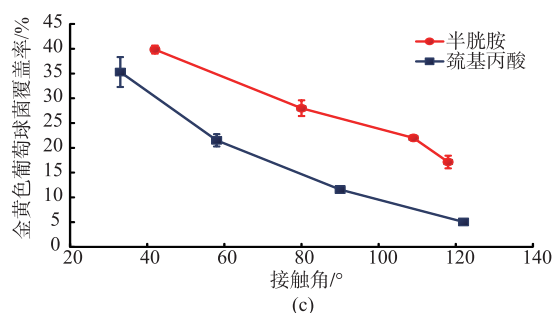
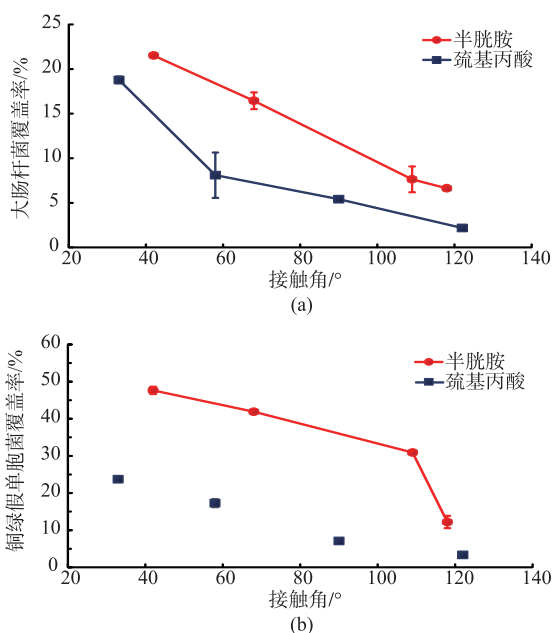


图5 大肠杆菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌在不同浸润性的十八烷硫醇/半胱胺混合膜或十八烷硫醇/巯基丙酸混合膜表面的覆盖率

Fig. 5 *E.coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* coverage rate on grafted samples with different contact angles

3 结语

材料表面的不同性质对细菌粘附情况的影响非常复杂。作者通过在材料表面接枝不同比例的十八烷硫醇/半胱胺,或十八烷硫醇/巯基丙酸混合单分子层,利用3种不同性质的常见致病菌,研究材料表面浸润性对细菌粘附情况的影响。实验发现,随着疏水性的增加,细菌在材料表面的粘附量逐渐降低,在疏水性材料表面的粘附量远远低于亲水性材料表面。另外,材料表面的带电性也对其抗细菌粘附的能力有影响,由于大多数细菌的表面带负电,其与同样带负电的表面之间存在静电排斥,有利于提高材料表面的抗粘附性。这些结果能够帮助理解细菌在材料表面粘附的内在机理,同时有助于抗菌材料的设计和制备。

参考文献:

- [1] SCHARFF R L. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States[J]. **Journal of Food Protection**, 2012, 75(1):123-131.
- [2] RENNER L D, WEIBEL D B. Physicochemical regulation of biofilm formation[J]. **MRS Bulletin**, 2011, 36(5):347-355.
- [3] HOUARI A, DI M P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation[J]. **Letters in Applied Microbiology**, 2007, 45(6):652-656.
- [4] SONG F, KOO H, REN D. Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation[J]. **Journal of Dental Research**, 2015, 94(8):1027-1034.
- [5] MENG J, ZHANG P, WANG S. Recent progress in biointerfaces with controlled bacterial adhesion by using chemical and physical methods[J]. **Chemistry-An Asian Journal**, 2014, 9(8):2004-2016.
- [6] CAO Z, MI L, MENDIOLA J, et al. Reversibly switching the function of a surface between attacking and defending against

- bacteria[J]. **Angewandte Chemie International Edition**, 2012, 51(11):2602-2605.
- [7] KINGSHOTT P, WEI J, BAGGE R D, et al. Covalent attachment of poly (ethylene glycol) to surfaces, critical for reducing bacterial adhesion[J]. **Langmuir**, 2003, 19(17):6912-6921.
- [8] SATOU N, SATOU J, SHINTANI H, et al. Adherence of streptococci to surface-modified glass [J]. **Journal of General Microbiology**, 1988, 134(5):1299-1305.
- [9] MORRA M, CASSINELLI C. Non-fouling properties of polysaccharide-coated surfaces [J]. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, 1999, 10(10):1107-1124.
- [10] ZHOU Kun, JIANG Zhongying. Electrochemical behaviors of hybrid self-assembled monolayers modified electrode [J]. **Journal of Soochow University: Natural Science Edition**, 2011, 27(4):47-52. (in Chinese)
- [11] FRIEDLANDER R S, VLAMAKIS H, KIM P, et al. Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2013, 110(14):5624-5629.
- [12] AHN J, SOHN E H, BANG S H, et al. Biocompatible Ag nanoparticle-embedded poly (2-hydroxyethyl methacrylate) derivative films with bacterial adhesion-resistant and antibacterial properties [J]. **Macromolecular Research**, 2014, 22(3):337-343.
- [13] HUANG Jianhua, JIANG Wenhua, HAN Shijun. Monte Carlo study on conformation properties of tail-like chain of block copolymer [J]. **Chemical Journal of Chinese Universities**, 2004, 25(1):179-183. (in Chinese)
- [14] WU Rangquan, LI Fanting, CHENG Zhengdi. Randomized studies excluded volume effect of the polymer chain [J]. **Chinese Science Bulletin**, 1981, 12:23. (in Chinese)
- [15] HUANG Baowei, ZHANG Hongmei, LIU Xuelu, et al. Different patterns of biofilm formation and effect of Sub-MIC disinfectant on biofilm formation of foodborne pathogen [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(5):757-760. (in Chinese)
- [16] ARIMA Y, IWATA H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers [J]. **Biomaterials**, 2007, 28(20):3074-3082.
- [17] LEE J H, KHANG G, LEE J W, et al. Interaction of different types of cells of polymer surfaces with wettability gradient [J]. **J Colloid Interface Sci**, 1998, 205(2):323-330.

会 议 消 息

会议名称:第五届酶国际研讨会(ICE 2019)

The 5th Int'l Conference on Enzyme (ICE 2019)

会议时间:2019-07-19 至 2019-07-21

会议地点:广西桂林

主办单位:Engii

联系人:Rolin

电话:13264702250

Email: intelconf@163.com

官方网址: <http://www.confjuly.org/conference/ICE2019/>

在线投稿链接: [http://www.confjuly.org/RegistrationSubmission/default.aspx?](http://www.confjuly.org/RegistrationSubmission/default.aspx?ConferenceID=1129)

ConferenceID=1129

邮箱投稿: intelconf@163.com 录用通知: 论文投稿后 1 周左右

会议简介: ICE 2019 旨在为业内专家学者分享技术进步和业务经验, 聚焦酶的前沿研究, 提供一个交流的平台。会议将集聚来自世界各地的科研人员、工程师、学者及业界专家, 展示他们在酶领域的最新研究成果及活动进展。

大会咨询:

联系人: 张老师 (Rolin)

邮箱: intelconf@163.com

QQ: 3025797047

电话: 13264702250