

维氏气单胞菌生物膜体外模型的建立及影响因素的研究

夏京津^{1#}, 张海月^{1#}, 许瑞¹, 张冬星¹, 龙继兵¹, 徐洋²,
沈锦玉², 康元环¹, 单晓枫^{1*}, 钱爱东^{1*}

(1. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118; 2. 农业部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省淡水水产研究所, 浙江湖州, 313001)

[收稿日期] 2015-07-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2015) 10-0010-05 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为探索不同理化因素对致病性维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*, AV) TH0426 成膜的影响, 采用改良微孔板法建立致病性 AV 生物膜体外模型并对其进行了研究。结果表明, AV TH0426 能够在聚乙烯酶标板表面形成生物膜, PH 值 4~6, 10 ℃ 和 NaCl 浓度 4 g/L 培养 18 h 是形成生物膜的最适条件, 黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)的肝脏提取液对 AV TH0426 形成生物膜有促进作用。这为进一步探讨维氏气单胞菌生物膜形成机制和致病机理提供了参考。

[关键词] 维氏气单胞菌; 形成特性; 生物膜; 影响因素

Establishment of *in vitro* Biofilm Model and Influence Factors of *Aeromonas veronii*

XIA Jing-jin^{1#}, ZHANG Hai-yue^{1#}, XU Rui¹, ZHANG Dong-xing¹, LONG Ji-bing¹, XU Yang²,
SHEN Jin-yu², KANG Yuan-huan¹, SHAN Xiao-feng^{1*}, QIAN Ai-dong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Key Laboratory of Health and Aquaculture of Freshwater Fisheries, Ministry of Agriculture, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou, Zhejiang 313001, China)

Abstract: To study the effect of different factors on bacterial biofilm formation *in vitro*, the modified microtiter-plate test was used to establish an *in vitro* biofilm model of pathogenic *Aeromonas veronii* TH0426 strain. The results showed that AV TH0426 could develop biofilm on the surface of the polystyrene microtiter plate, and the optimum conditions for biofilm formation of AV TH0426 strain were pH 4~6, temperature 10 ℃, NaCl (4 g/L), and culturing for 18 h. The extract of liver increased the ability of biofilm formation by testing on the AV TH0426.

Key words: *Aeromonas veronii* (AV); characteristics; biofilm; physical factor

细菌生物膜 (Biofilm, BF) 是指无柄微生物群落在各种载体表面上附着了一层由其自分泌的胞

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31201927); 吉林省重点科技攻关项目 (20150204065NY); 国家大学生创新创业训练计划 (201410193023)

作者简介: 夏京津, 从事水产微生物学研究; 张海月, 硕士研究生, 从事动物分子细菌研究, 与夏京津为并列第一作者。

通讯作者: 单晓枫, E-mail: sxfl997@163.com; 钱爱东, E-mail: qianaidong0115@163.com

外多糖类基质^[1],是细菌相对于浮游状态的一种群体生活方式。与游离的菌相比其形成生物膜的微生物具有很多不同的特征,标志性的特征就是对于抗菌剂的抗性增强,它可作为一种生物屏障,使存在于其中的菌体(被膜菌)相对于其单个浮游状态的菌体(浮游菌)对抗菌药物表现出更强的抗性。胞外基质还能有效的抑制免疫细胞的吞噬作用^[2],并且生物膜还能通过释放游离的细菌导致再次感染,病原菌持续存在,导致慢性持续性感染或感染反复发作,是目前临床上一大难题,为临床抗感染治疗带来极大挑战。

维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*, AV)广泛分布于水体环境中,是一种新型人-兽-鱼共患病菌^[3]。该菌不但可引起鲤、鲫、鳊及鲟鱼等多种鱼类发病,表现为出血和腹水;也可引起人的腹泻、脑膜炎及败血症等。研究表明,维氏气单胞菌对人和多种水产动物具有较强感染性和致病力。近年来,有关维氏气单胞菌方面的报道逐渐增多,但其有关生物膜的研究还尚未见报道。本研究以源自黄颡鱼(*Pseudobagrus fulvidraco*)的一株致病性 AV TH0426 为实验材料,初步建立生物膜体外模型,并对生物膜形成的不同影响因素进行研究,为探讨维氏气单胞菌的生物膜形成机制和致病机理提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养条件 黄颡鱼源 AV TH0426 菌株由浙江省淡水水产研究所徐洋助理研究员惠赠。接种于 TSB 中,培养至对数生长期,离心收集菌体,无菌生理盐水调 OD₆₀₀ 值至 0.3 左右备用。

1.2 试剂 TSB 培养基、RS 鉴别培养基,购自北京陆桥技术责任公司;1% 结晶紫溶液(自制)、0.85% 生理盐水(自制)、PBS(自制);BCA(BCA Protein Assay Kit)试剂盒,购自凯基生物科技有限公司。

1.3 生物膜的形成与测定 体外生物膜形成和测定方法参考毛秀秀等^[4]的微孔板法并进行适当改进,具体步骤如下:将细菌悬液与 TSB 按 1:3 体积混合均匀后取 200 μL 加入到 96 孔酶标板中,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 20 h 后弃去培养液,用生理盐水清洗 3 次以去除

游离细菌,60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 40 min 后并加入 200 μL 1% 结晶紫溶液染色 10 min,生理盐水清洗 3 次,加入 33% 乙酸 200 μL 溶解与生物膜结合的结晶紫,0.5 h 后用酶标仪测定 OD₅₉₀ 值。各实验均设 11 个平行,以不含菌液的培养液为空白对照。测定值减去空白对照值大于 0.12 判定生物膜为阳性^[5]。

1.4 不同培养时间对 AV TH0426 生物膜形成的影响 将培养时间设置为 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、36、48、60 h,按 1.2 项方法测定生物膜形成。

1.5 不同初始菌液浓度对 AV TH0426 生物膜形成的影响 将 AV TH0426 的起始浓度调至 2.0×10^9 、 2.0×10^8 、 2.0×10^7 、 2.0×10^6 、 2.0×10^5 、 2.0×10^4 、 2.0×10^3 、 2.0×10^2 CFU/mL 的菌液,按 1.2 项方法测定生物膜形成。

1.6 不同培养温度、pH 值对 AV TH0426 生物膜形成的影响 将培养温度设置为 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 $^{\circ}\text{C}$ 、15 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、35 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$;配制 pH 值分别为 3、4、5、6、7、8、9、10,按 1.2 项方法测定不同温度 and 不同 pH 值对 AV TH0426 形成生物膜的影响。

1.7 不同 NaCl 浓度对 AV TH0426 生物膜形成的影响 分别配制含不同浓度 NaCl 的 TSB 培养液,NaCl 浓度分别为 0、2、4、10、20、30、50 g/L,以去离子水制备菌液进行无离子状态实验,按 1.2 项方法测定不同 NaCl 浓度对生物膜形成的影响。

1.8 不同组织提取液包被对 AV TH0426 生物膜形成的影响

1.8.1 黄颡鱼不同组织提取液的制备 参考 Chen 等^[6]方法分别收集一定量的黄颡鱼肌肉、肝脏、脾脏、小肠、肾脏提取其蛋白,采用 BCA 试剂盒将蛋白质含量调至 1 mg/mL,然后采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌 2 次,再放置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.8.2 黄颡鱼不同组织提取液包被对 AV TH0426 生物膜形成的影响 在 96 孔酶标板各孔分别加入 200 μL 制备的黄颡鱼肌肉、肝脏、脾脏、小肠、肾脏的组织提取液,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被 18 h 后弃去残留的组织液,用 250 μL 生理盐水清洗 2 次,按 1.2 项方法测定不同组织提取液包被后所形成的生物膜的 OD₅₉₀

值。以未经组织液包被的酶标板为阴性对照。

1.9 数据处理 结果以平均值±标准差表示,用SPSS 16.0 进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 培养时间对 AV TH0426 生物膜形成的影响

图 1 为不同培养时间对 AVTH0426 形成生物膜的影响,从图中可以看出其生物膜形成量出现二个峰值,尤以培养 18 h 形成量最高,之后随培养时间的延长而逐渐降低。

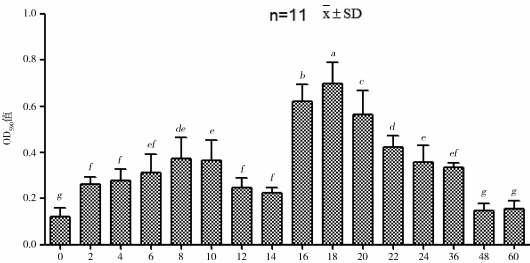


图 1 不同培养时间 AV TH0426 形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值 (柱上完全不同的字母表示组间数据差异显著 $P < 0.05$, 其他字母表示组间数据差异不显著 $P > 0.05$)

2.2 初始菌液浓度对 AV TH0426 生物膜形成的影响

从图 2 可以看出,随着初始菌液浓度的降低,AV TH0426 生物膜的形成量呈逐渐降低的趋势,初始菌液浓度在 2×10^9 CFU/mL 和 2×10^8 CFU/mL 时,细菌生物膜形成量最大,两者在统计学意义上无显著差异;但 OD₅₉₀ 的数值直观显示,初始菌液浓度在 2×10^9 CFU/mL 时,细菌生物膜形成量更大。

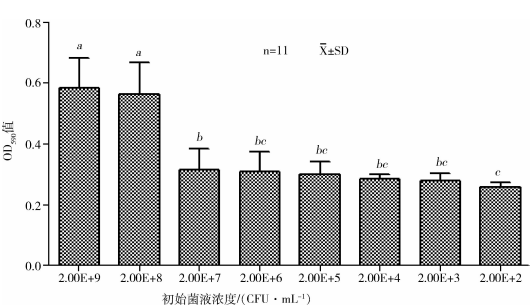


图 2 不同初始菌液浓度 AV TH0426 形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值 (柱上完全不同的字母表示组间数据差异显著 $P < 0.05$, 其他字母表示组间数据差异不显著 $P > 0.05$)

2.3 培养温度对 AV TH0426 生物膜形成的影响

从图 3 可以看出在 10 ℃ 是生物膜生成量最高 ($P < 0.05$),在 15 ℃、20 ℃、25 ℃、30 ℃ 和 35 ℃ 时生物膜形成量逐渐降低,在 4 ℃ 时 AV TH0426 能形成生物膜,在 40 ℃ 时不能形成生物膜。

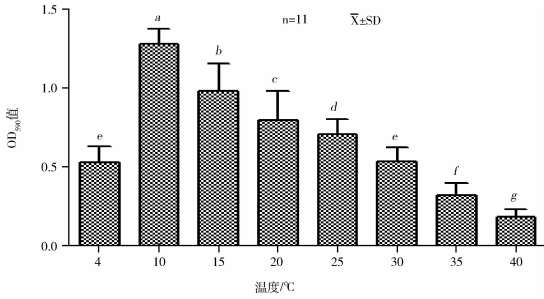


图 3 不同温度 AV TH0426 形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值 (柱上完全不同的字母表示组间数据差异显著 $P < 0.05$, 其他字母表示组间数据差异不显著 $P > 0.05$)

2.4 不同 pH 值对 AV TH0426 生物膜形成的影响

在起始 pH 值为 3 时 AV TH0426 生物膜形成量较低。在起始 pH 值为 4~10 范围内均能形成较多生物膜,其酸性条件下比中性和碱性更容易形成生物膜 ($P < 0.05$)。

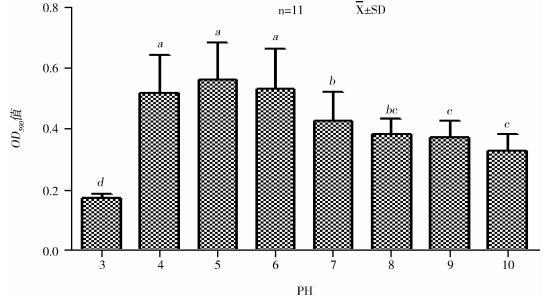


图 4 AV TH0426 在不同 pH 值条件下形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值 (柱上完全不同的字母表示组间数据差异显著 $P < 0.05$, 其他字母表示组间数据差异不显著 $P > 0.05$)

2.5 不同 NaCl 浓度对 AV TH0426 生物膜形成的影响

从图 5 可以看出 NaCl 浓度在 0 g/L 时 AV TH0426 能形成生物膜,添加 NaCl 生物膜形成量明显增加,在 4 g/L 时生物膜形成量最大,30、50 g/L 时 AV TH0426 几乎不能形成生物膜。

2.6 黄颡鱼不同组织提取液包被对 AV TH0426 生物膜形成的影响

AV TH0426 在黄颡鱼的肝脏提取液包被的 96 孔酶标板上生物膜形成量增加 ($P < 0.05$),而

在小肠、脾脏、肌肉、肾脏组织提取液包被的酶标板上的生物膜形成量与对照组差异不显著($P > 0.05$)。

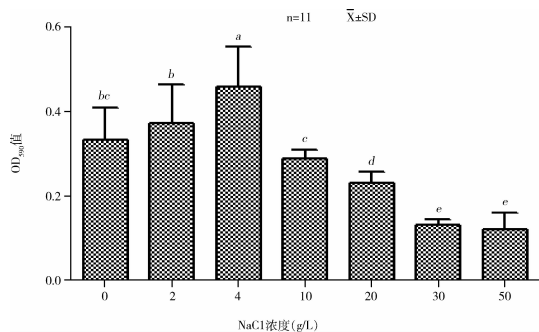


图5 AV TH0426 在添加不同 NaCl 浓度条件下形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值(柱上完全不同的字母表示组间数据差异显著 $P < 0.05$, 其他字母表示组间数据差异不显著 $P > 0.05$)

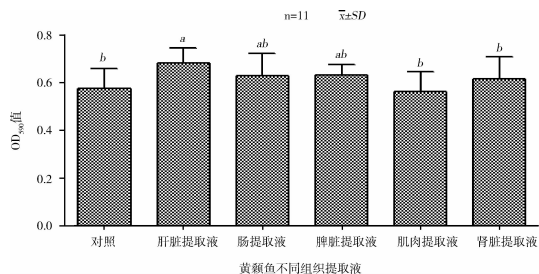


图6 AV TH0426 在包被不同组织提取液的酶标板上形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值(柱上完全不同的字母表示组间数据差异显著 $P < 0.05$, 其他字母表示组间数据差异不显著 $P > 0.05$)

3 讨论与小结

已有研究发现,细菌生物膜的形成是一个动态过程,包括可逆性黏附、不可逆性黏附、微菌落形成、生物膜成熟和解聚等阶段,在各阶段具有不同的生理生化特性^[7-10]。本研究结果显示,AV TH0426 的生物膜形成基本上也可以分为4个阶段,0~10 h 为早期黏附阶段,主要培养液中的游离菌黏附于酶标板表面并开始繁殖,导致酶标板表面的维氏气单胞菌生物量逐步增加;10~14 h 为中间形成阶段,然而该阶段生物膜形成量呈短暂的降低趋势,可能是细菌二次生长的缘故,维氏气单胞菌先利用易吸收的营养,再适应另一种易于形成生物膜的营养因子;14~18 h 为生物膜成熟阶段,维氏气单胞菌生物膜形成量逐步增长;22 h 之后为消退阶段,表

现为该菌生物膜的量逐渐减少。

在研究初始浓度对维氏气单胞菌生物被膜形成影响的结果发现,菌液的起始浓度达到 2×10^8 CFU/mL 以上时更容易形成大量的生物膜,这与齐显龙等^[11]的结果一致;而陈强等^[12]的研究也表明细菌的黏附量与菌浓度成正比,因此,黏附被认为是细菌在基质上成膜的第一步,表明细菌起始浓度高有利于在基质上的黏附,进而有利于生物膜的形成。综上,AV TH0426 生物膜的形成可能主要是来自培养液中细菌的集聚。

AV TH0426 的最适生长温度为 $25 \sim 35$ °C^[3],与其成膜最适温度不一致。这说明生物膜的形成与其正常生长繁殖和生理活动上有所不同;与此结果相类似的是,AV TH0426 适合生长的 pH 值为中性,其生物膜形成能力在酸性环境下较强。形成这些结果的具体原因,仍需进一步研究探讨。

当 NaCl 浓度较低时,AV TH0426 生物膜的形成量随着 NaCl 浓度的增加而增加,这表明氯化钠可促进生物膜的生成,与其他细菌的结果类似^[13]。当 NaCl 浓度过高时,细菌形成生物膜受到抑制,原因可能是渗透压过高,细菌受到来自环境的生存压力较大,生长受到影响,进而影响生物膜的形成。

Sutherland^[14]研究发现糖和蛋白质在生物膜的形成过程中发挥着重要的作用。本试验发现,AV TH0426 在黄颡鱼的肝脏组织提取液包被的 96 孔酶标板上生物膜形成量增加,而在小肠、脾脏、肌肉和肾脏组织提取液包被的酶标板上的生物膜形成量与对照组差异不显著,其原因也有待进一步研究。

本试验结果表明,AV TH0426 生物膜的形成受多种因素的影响,如菌液初始浓度、温度、pH 值、NaCl 浓度以及黄颡鱼不同组织提取液等对 AV TH0426 生物膜的形成均具有一定的影响;其中 pH 值 4~6, 10 °C 和 NaCl 浓度 4 g/L 培养 18 h 是形成生物膜的最适条件,黄颡鱼的肝脏提取液对 AV TH0426 形成生物膜有促进作用。本研究结果将为进一步探讨维氏气单胞菌生物膜形成机制和致病机理提供依据。

参考文献:

- [1] Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms [J]. Plos Biology, 2007, 5(11):2458–2461.
- [2] Borriello G, Werner E, Roe F, *et al.* Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonasaeruginosa* in biofilms [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(7): 2659–2664.
- [3] 吴同垒, 单晓枫, 孟庆峰, 等. 维氏气单胞菌研究进展, 中国兽药杂志[J]. 2011, 45(7):41–44.
- [4] 毛秀秀, 覃映雪, 邹文政, 等. 致病性嗜水气单胞菌生物膜的形成特性[J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 371–378.
- [5] 喻华英, 闫石磊. 两株大肠埃希菌生物膜形成及影响因素 [J]. 西北农业学报, 2012, 21(12):1–6.
- [6] Chen Q, Yan Q, Wang K, *et al.* The portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into *Pseudosciaenacrocea* and characteristic of the bacterial adhesion to the mucus [J]. Dis Aqu Organ, 2008, 80: 181–188.
- [7] Sauer K, Camper A K, Ehrlich G D, *et al.* *Pseudomonasaeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm [J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(4): 1140–1154.
- [8] Webb J S, Givskov M, Kjelleberg M. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity [J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6: 578–585.
- [9] Simoes M, Pereira M O, Vieira M J. Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilms formed under different flow regimes [J]. Water Research, 2005, 39(2/3): 478–486.
- [10] Sternberg C, Christensen B B, Johansen T, *et al.* Distribution of bacterial growth activity in flow–chamber biofilms [J]. Appl Environ Microbiol. 1999, 65: 4108–4117.
- [11] 齐显龙, 孙东杰, 徐修礼, 等. 痤疮丙酸杆菌生物膜的构建 [J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2007, 23(2): 126–128.
- [12] 陈强, 鄢庆枇, 邹文政, 等. 环境因子对溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 粘附大黄鱼 (*Pseudosciaenacrocea*) 表皮粘液影响的研究 [J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(4):361–366.
- [13] Donbnsky S, Kiel K, Rohde H, *et al.* Glucose–related dissociation between *ica* ADBC transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesion synthesis [J]. J Bacteriol, 2003, (185):2879–2886.
- [14] Sutherland I W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework [J]. Microbiology, 2001, 14(1): 3–9.

(编辑:侯向辉)