

单核细胞增生李斯特氏菌生物膜形成特性

陈康勇¹, 彭芳¹, 薛竣仁¹, 钟为铭¹, 高志鹏^{1,2*}

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南长沙 410128; 2. 水产高效健康生产湖南省协同创新中心, 湖南常德 415000)

摘要 [目的]研究单增李斯特氏菌生物膜的形成特性。[方法]采用24孔板法培养生物膜, 分别采用结晶紫染色法和光学显微镜进行生物膜的定量和定性研究, 观察在不同培养时间(8、16、24、32、40、48 h)单增李斯特氏菌生物膜的形成状况。[结果]随着培养时间的增加, 单增李斯特氏菌生物膜生物量逐渐增加, 生物膜经历了黏附、微菌落形成、大菌落形成到成熟的全部过程。[结论]试验结果为单增李斯特氏菌生物膜相关研究提供了理论依据。

关键词 单核细胞增生李斯特氏菌; 生物膜; 形成特性

中图分类号 S852.61 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)24-0016-03

Biofilm Formation Characteristics of *Listeria monocytogenes*

CHEN Kang-yong¹, PENG Fang¹, XUE Jun-ren¹, GAO Zhi-peng^{1,2*} et al (1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128; 2. Collaborative Innovation Center for Efficient and Health Production of Fisheries in Hunan Province, Changde, Hunan 415000)

Abstract [Objective] The aim was to investigate the biofilm formation characteristics of *Listeria monocytogenes*. [Method] To investigate the characteristics of *Listeria monocytogenes* biofilm at different incubation times (8, 16, 24, 32, 40, 48 h), 24-well plate method was used to cultivate biofilm, and quantitative and qualitative data were obtained by crystal violet staining assay and light microscopy. [Result] With the increase of culture time, the biomass of *Listeria monocytogenes* biofilm increased gradually, and the biofilm went through the process of adhesion, microcolony formation, macrocolony formation to mature. [Conclusion] The results provide a theoretical basis for the related research of *Listeria monocytogenes* biofilm.

Key words *Listeria monocytogenes*; Biofilm; Formation characteristics

生物膜(BF)是细菌为了适应生存环境, 黏附于非生物或者活性组织的表面, 包被于自身分泌的胞外基质中, 形成的一种三维聚合网状结构, 细菌生物膜是一种和浮游生长对应的生长方式^[1-3]。生物膜参与65%以上的感染, 尤其是与医疗器械相关的、机体表面的(如皮肤、软组织等)和慢性感染, 原因主要是生物膜对宿主防御和抗菌药物具有很强的抵御能力^[4-6]。生物膜是细菌耐药性产生的重要原因, 可使细菌的耐药性提高10~1 000倍^[7-8]。生物膜感染已成为全球关注的问题。

单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)是一种能在冷藏的温度下进行繁殖的致病菌, 由于该细胞的苯酚-水浸出物能够诱导单核细胞生成, 所以被命名为“单核增生细菌”^[9]。人或者牲畜感染之后主要表现出败血症、胃肠炎、脑膜炎、孕妇流产等症状^[10]。婴幼儿、老年人以及免疫耐受病人的临床死亡率约为30%^[11]。该菌种在自然界广泛存在, 对于不利的生长环境条件具有很强的耐受能力, 在4℃冰箱中可生长繁殖, 所以各类冷冻食品均成为被感染对象, 如肉制品、奶制品、冰激凌等^[12]。在对含有单增李斯特氏菌的乳制品进行超高压处理研究中发现, 在500 MPa、10 min、20℃下处理乳制品, 虽然能够降低其单增李斯特氏菌活菌量, 但仍有细菌存活并繁殖^[13]。同时, 单增李斯特氏菌对水产品也具有较高的污染程度^[14-15]。单增李斯特氏菌所产生

的生物膜可保护其不受抗菌药物作用, 并且能降低机体免疫细胞的吞噬作用。试验表明, 在任何温度条件下, 单增李斯特氏菌可在固体表面形成生物膜, 并且能够在很长时间黏附于固体表面, 其生物膜的形成引起了食品、用品卫生安全的隐患^[16]。单增李斯特氏菌生物膜所导致的相关性疾病患病率逐年上升, 至今很少有药物能有效控制该类感染, 深入研究单增李斯特氏菌生物膜形成特性, 对于寻找有效的防治药物和方法具有重要意义。笔者研究了单增李斯特氏菌生物膜的形成过程, 以期单增李斯特氏菌研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌。单核细胞增生李斯特氏菌(编号: ATCC19115), 购自广东省微生物研究所。

1.1.2 主要试剂。LB肉汤(广东环凯微生物科技有限公司)、技术琼脂粉(广东环凯微生物科技有限公司)、0.1%结晶紫溶液(Sigma公司)、95%乙醇溶液、磷酸盐缓冲液(PBS)和4%多聚甲醛(Sigma公司)。

1.1.3 主要仪器。荧光多功能酶标仪、光学显微镜、24孔和96孔细胞培养板、高压灭菌锅和高速彩色平台扫描仪。

1.2 方法

1.2.1 单增李斯特氏菌生物膜培养。采用24孔板法, 具体操作: 取单个单增李斯特氏菌菌落接种到5 mL LB液体培养基中, 37℃静置培养24 h。取10 μL菌液转接至预先加入无菌盖玻片(12 mm)和2 mL新鲜LB培养液的24孔细胞培养板中, 然后37℃静置培养。

1.2.2 不同培养时间对单增李斯特氏菌生物膜形成特性的影响。按培养时间分别设置8、16、24、32、40、48 h 6个试验组, 每组分别做6个平行, 按照“1.2.1”进行生物膜培养, 在

基金项目 国家级大学生创新创业训练计划项目[(G)SCX1510]; 湖南省教育厅科学研究项目(16B125); 湖南农业大学青年科学基金项目(15QN01); 湖南农业大学大学生创新性实验计划项目(CXC17075)。

作者简介 陈康勇(1995—), 男, 广东湛江人, 本科生, 专业: 水产养殖。
*通讯作者, 讲师, 博士, 从事水生动物病原微生物研究。

收稿日期 2017-07-26

上述时间点进行结晶紫染色试验和显微镜观察。

1.2.3 单增李斯特氏菌生物膜结晶紫染色试验。利用生物膜内物质可与特殊染料结合的原理,通过染色的方法对生物膜进行定性或定量分析。单增李斯特氏菌生物膜形成后,将 24 孔板从培养箱中取出,吸出培养液,用无菌 PBS 浸洗盖玻片 3 次,然后用 4% 多聚甲醛固定 20 min,弃固定液,并用无菌 PBS 浸洗 3 次,洗去浮游菌,使黏附在盖玻片的生物膜自然风干,室温下用 0.1% 结晶紫染色 20 min,吸除染色液后,用无菌 PBS 浸洗 3 次,自然风干,然后用高速彩色平台扫描仪扫描拍照。

1.2.4 单增李斯特氏菌生物膜生物量的测定。单增李斯特氏菌生物膜形成后,吸出培养液,用无菌 PBS 浸洗盖玻片 3 次,每孔加入 200 μ L 95% 乙醇,置于摇床 30 min 使结晶紫完全溶解,溶解液转移至 96 孔细胞培养板中,并用酶标仪测定 540 nm 波长处的吸光度,即 OD₅₄₀,每个试验重复 3 次。

1.2.5 显微镜观察单增李斯特氏菌生物膜。方法同

“1.2.3”,结晶紫染色后,用无菌 PBS 浸洗盖玻片 3 次,然后置于 100 倍油镜下观察生物膜的形成状况,并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 不同培养时间下单增李斯特氏菌生物膜结晶紫染色结果 研究发现单增李斯特氏菌生物膜的形成分为 4 个阶段,即黏附阶段、微菌落形成阶段、大菌落形成阶段和成熟阶段。

①黏附阶段(0 ~ 16 h):细菌逐渐聚集并黏附于介质(盖玻片)表面,生物膜形成速度较慢;②微菌落形成阶段(17 ~ 24 h):生物膜结晶紫染色较浅,微菌落开始形成,并呈斑块状分布;③大菌落形成阶段(25 ~ 32 h):细菌聚集明显,生物膜斑块变大,32 h 时布满盖玻片,结晶紫染色加深;④成熟阶段(33 ~ 48 h):结晶紫染色比前 32 h 明显加深,生物膜斑块更加密集,厚度增大,40 h 时生物膜基本形成,33 ~ 48 h 形成的生物膜的 OD₅₄₀ 快速增长。随着培养时间的增加,单增李斯特氏菌的生物膜呈现出从黏附聚集到成熟的过程,于 48 h 达到最成熟的状态(图 1、2)。

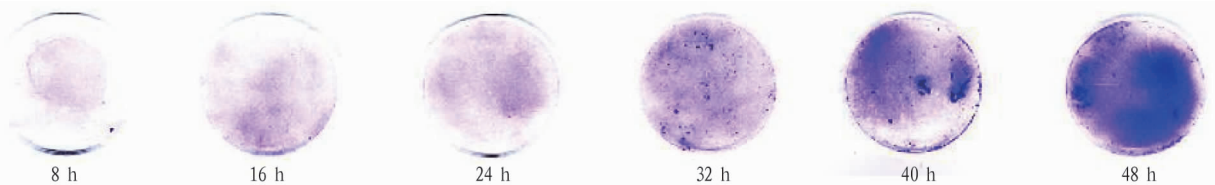


图 1 不同培养时间单增李斯特氏菌生物膜结晶紫染色情况

Fig.1 Biofilm violet staining of *Listeria monocytogenes* at different incubation time

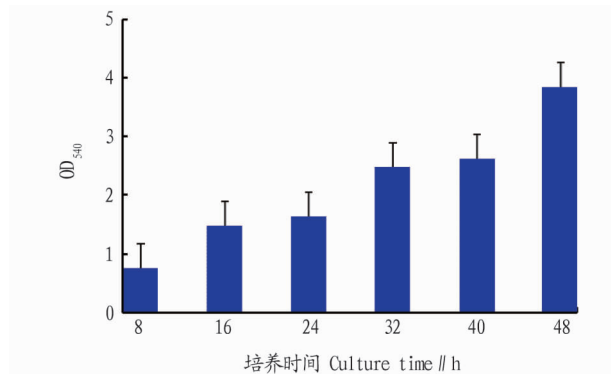


图 2 不同培养时间单增李斯特氏菌生物膜生物量变化情况

Fig.2 The biofilm biomass of *Listeria monocytogenes* at different incubation time

2.2 不同培养时间下单增李斯特氏菌生物膜显微观察结果 ①黏附阶段:在物镜为 100 倍的显微镜下可观察到生物膜的厚度小,菌落间的通道多,说明生物膜形成并不成熟。②微菌落形成阶段:微菌落开始形成,生物膜斑块数量增多,生物膜的厚度开始增加,菌落间通道变少。③大菌落形成阶段:结晶紫染色变深,开始形成较为致密的生物膜,但生物膜斑块比较分散,菌落间通道继续变少。④成熟阶段:生物膜斑块大量增加并且形成了牢固、稳定的网状三维结构,生物膜厚度明显增加,染色显著加深,培养至 48 h 时生物膜极厚,菌落之间几乎没有通道,生物膜完全成熟(图 3)。可见,生物膜形成期间,菌落间的通道不断减少,生物膜斑块逐渐增加并且密集,生物膜的厚度逐渐增加,并趋于成熟。

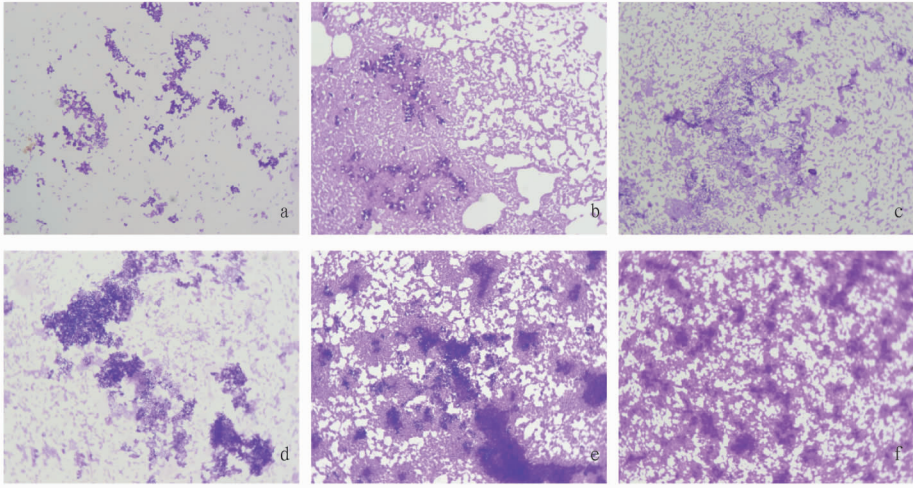
3 讨论

细菌生物膜的形成是一个动态过程,随着细菌的生长,生物膜对营养因子的通透性变差,同时细菌也开始老化甚至失去了成膜能力。进入成熟期后,随着生存环境中营养等限制因子的消耗以及代谢产物的积累,细菌的生长开始受到限制,生物膜的形成达到一个相对稳定的状态,此时生物膜的厚度基本稳定。进入衰老期后,伴随着营养物质的不断消耗,生物膜中细菌的大部分蛋白质和 RNA 的合成速率降低,致使胞外多糖的合成量减少,生物膜的结构出现崩解甚至细菌也开始从生物膜表面脱落,再次成为游离菌,使生物膜的厚度减少。

单增李斯特氏菌生物膜的形成是一个复杂的过程,涉及到多种蛋白、核酸分子和多糖等因素,同时也受到各种调控网络的共同作用。深入研究单增李斯特氏菌生物膜的形成和调控的分子机制对寻找特异性干预靶点具有重要意义。该试验目前只是研究培养时间对单增李斯特氏菌生物膜形成的影响,主要是通过观察细菌生物膜的形成情况来说明培养时间对生物膜的影响,后续试验还可研究环境因素对单增李斯特氏菌生物膜基质组成的影响,通过观察环境因素对生物膜中蛋白质、胞外多糖、胞外 DNA 组成的影响,进一步探究单增李斯特氏菌生物膜的形成机制。

4 结论

采用 24 孔板法和结晶紫染色法研究单增李斯特氏菌生物膜的形成过程,发现在静置培养条件下的单增李斯特氏菌生物膜的形成经历了 4 个阶段,0 ~ 16 h 为细菌黏附阶段,



注:a. 8 h;b. 16 h;c. 24 h;d. 32 h;e. 40 h;f. 48 h

图3 100倍显微镜下不同培养时间单增李斯特氏菌生物膜的微观形态

Fig.3 Microscopic morphology of *Listeria monocytogenes* biofilm at different incubation time under 100-fold microscope

17~24 h 为微菌落形成阶段,25~32 h 为大菌落形成阶段,33~48 h 为成熟阶段。细菌黏附阶段,菌落间的通道多,形成生物膜速度慢。微菌落形成阶段,随着培养时间的延长,生物膜结晶紫染色颜色变深,细菌开始形成微菌落,但形成速度较慢,并开始形成生物膜斑块。大菌落形成阶段,细菌形成的大量微菌落聚集成大菌落,生物膜斑块增大,开始形成较为致密的生物膜,结晶紫染色快速变深。成熟阶段,生物膜斑块快速增大并且密集,形成了具有牢固、稳定的网状三维结构的生物膜,菌落间的通道不断减少。培养 48 h 期间,单增李斯特氏菌生物膜的生物量随培养时间的增加而增大,表明细菌生物膜的生长经历了从黏附聚集到成熟的过程,在 48 h 生物膜生长达到完全成熟的状态。

参考文献

- [1] HALL-STOODLEY L,STOODLEY P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens[J]. Trends in microbiology,2005,13(1):7-10.
- [2] 袁海兰,苏建,胡鲲,等. 环境因子对水霉菌生物膜形成的影响[J]. 微生物学通报,2014,41(9):1829-1836.
- [3] 徐文生,张艳艳,黄漫青,等. 环境因素对长双歧杆菌 CICC6069 生物膜生成的影响[J]. 中国食品学报,2012,12(4):36-42.
- [4] COSTERTON J W,STEWART P S,GREENBERG E P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections[J]. Science,1999,284(5418):1318-1322.
- [5] O'TOOLE G, KAPLAN H B, KOLTER R. Biofilm formation as microbial development[J]. Annual review of microbiology,2000,54(1):49-79.
- [6] KOLTER R. Biofilms in lab and nature: A molecular geneticist's voyage to microbial ecology[J]. International microbiology,2010,13(1):1-7.
- [7] 祝司霞. 细菌生物膜的结构及形成机制的研究进展[J]. 沈阳医学院学报,2015,17(2):115-117.
- [8] EHRlich G D, AHMED A, EARL J, et al. The distributed genome hypothesis as a rubric for understanding evolution in situ during chronic bacterial biofilm infectious processes[J]. FEMS immunology and medical microbiology,2010,59(3):269-279.
- [9] 马里奥特. 食品卫生原理[M]. 4版. 北京:中国轻工业出版社,2001.
- [10] 吕素玲,谭冬梅,李秀桂. 广西食源性单核细胞增生李斯特菌耐药趋势分析[J]. 实用预防医学,2013,20(6):734-735.
- [11] MARIJA Z, KONRAD J D, WOLFGANG K. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments: A review[J]. LWT-Food science and technology,2011,44(2):351-362.
- [12] LEMON K P, FREITAG N, KOLTER R. The virulence regulator PrfA promotes biofilm formation by *Listeria monocytogenes*[J]. Journal of bacteriology,2010,192(15):3969-3976.
- [13] STEPANOVIĆ S, VUKOVIĆ C D, ĐAKIĆ I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation[J]. Journal of microbiological methods,2000,40(2):175-179.
- [14] 张海英,罗茂凰,高旗利,等. 食品中单核细胞增生李斯特氏菌的污染概况及防治[J]. 食品研究与开发,2003,24(6):154-156.
- [15] 郑俏慧. 冻水产品中单核细胞增生李斯特氏菌的检验研究[J]. 食品工程,2010(1):58-60.
- [16] 刘彤,陈晶瑜,韩北忠,等. 单核增生李斯特氏菌生物被膜的形成及控制[J]. 食品研究与开发,2010,31(2):163-166.
- [17] 聂亚平,王晓维,万进荣,等. 几种重金属(Pb、Zn、Cd、Cu)的超富集植物种类及增强植物修复措施研究进展[J]. 生态科学,2016(2):174-182.
- [18] 郑洁敏,宋亮. 放射性 Cs 污染土壤的植物修复及其影响因素[J]. 杭州农业科技,2006(1):33-35.
- [19] 王胜荣,张劲松,胡银,等. Cs、Sr、Co 在土壤中的吸附与迁移研究[C]//全国核化学与放射化学学术讨论会. 第十一届全国核化学与放射化学学术讨论会论文摘要集. 北京:中国核学会核化学与放射化学分会,2012:45-46.
- [20] 唐永金,罗学刚,曾峰,等. 不同植物对高浓度 Sr、Cs 胁迫的响应与修复植物筛选[J]. 农业环境科学学报,2013,32(5):960-965.
- [21] 赵文虎,徐世明,侯兰欣,等. 农作物食用部分中⁹⁰Sr、¹³⁷Cs 含量的早期预报:对⁹⁰Sr、¹³⁷Cs 具有高浓集力植物的筛选[J]. 中国核科技报告,1996(S1):272-291.
- [22] 杨俊诚,朱永懿,陈景坚,等. 植物对¹³⁷Cs 污染土壤的修复[J]. 核农学报,2005,19(4):286-290.
- [23] DUSHENKOV S, MIKHEEV A, PROKHNEVSKY A, et al. Phytoremediation of radiocesium-contaminated soil in the vicinity of chernobyl, ukraine[J]. Environmental science & technology,1999,33(3):469-475.
- [24] FUHRMANN M, LASAT M M, EBBES S D, et al. Uptake of cesium-137 and strontium-90 from contaminated soil by three plant species; application to phytoremediation[J]. Journal of environmental quality,2002,31(3):904.
- [25] BROADLEY M R, WILLEY N J. Differences in root uptake of radiocesium by 30 plant taxa[J]. Environmental pollution,1997,97(1/2):11-15.
- [26] 闻方平,王丹,徐长合,等. 苏丹草对¹³³Cs 和⁸⁸Sr 胁迫响应及吸收积累特征研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2009,27(4):212-217.
- [27] 张晓雪,王丹,张志伟,等. 水培条件下十种植物对⁸⁸Sr 和¹³³Cs 的吸收和富集[J]. 北方园艺,2009(10):65-67.
- [28] 任少雄,王丹,闻方平,等. 4种植物对¹³³Cs 和⁸⁸Sr 污染土壤的修复研究[J]. 西北植物学报,2012,32(7):1433-1439.

(上接第8页)