

研究报告

一株工业腐败物中魏氏柠檬酸杆菌的分离鉴定及
产生物膜特性分析李龙杰^{1,2} 周刚¹ 施庆珊^{1*} 陈艺彩¹ 陈仪本¹ 欧阳友生¹ 胡文锋²

(1. 广东省微生物研究所 省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)

(2. 华南农业大学 食品学院 广东 广州 510642)

摘要:【目的】分离和鉴定工业腐败物中高产细菌生物膜菌株,并明确该菌的部分产膜特性。

【方法】通过微孔板结晶紫染色法对分离的菌株进行产膜能力评价,根据菌落形态、生理生化特性和 16S rRNA 序列的系统进化树分析进行菌株鉴定;同时利用扫描电子显微镜(SEM)和结晶紫染色法分别研究材料及温度对该菌产膜特性和能力的影响。【结果】筛选出一株高产细菌生物膜菌株,经鉴定该菌为魏氏柠檬酸杆菌;其在玻璃、不锈钢和聚氯乙烯(PVC)材料表面均能形成生物膜;温度条件显著影响产膜能力,在 30 °C 时,菌株在 PVC 材料表面形成生物膜能力最强。【结论】工业腐败物中含有高产细菌生物膜菌株,并且产膜受附着物和温度影响。

关键词: 魏氏柠檬酸杆菌, 鉴定, 扫描电镜, 生物膜, 温度

Identification and biofilm formation characterization of *Citrobacter werkmanii* isolated from industrial spoilageLI Long-Jie^{1,2} ZHOU Gang¹ SHI Qing-Shan^{1*} CHEN Yi-Cai¹ CHEN Yi-Ben¹
OU YANG You-Sheng¹ HU Wen-Feng²

(1. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry-Province Joint Development), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(2. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: [Objective] A microorganism from the samples of industrial spoilage with high-yield bacterium biofilm was isolated and identified. Meanwhile studies on characterization of biofilm formation were also carried out. **[Methods]** First of all, crystal violet stain was used to evaluate the ability of the biofilm-forming of screened strains in 96-cell microplates. And then, colonial morphology, physio-biochemical tests and 16S rRNA sequence analysis were adopted to determine the phylogenetic position of the isolated strains. Finally, the effects of attachment materials and culture temperature on the characterization of biofilm formation were also researched using scanning electron mi-

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2011B010500024); 广东省科学院青年科学研究基金项目(No. qnjj201203)

*通讯作者: Tel: 86-20-87685717; 信箱: shiqingshan@hotmail.com

收稿日期: 2013-01-22; 接受日期: 2013-03-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

croscope (SEM) and crystal violet stain respectively. **[Results]** The best biofilm-forming strain was identified and clarified into *Citrobacter werkmanii*. And biofilm could be formed on the surfaces of glass, stainless steel and polyvinylchloride (PVC) respectively. Moreover the characterization of biofilm could be significantly influenced by temperature and the best biofilm was found on the PVC at 30 °C no matter which materials. **[Conclusion]** In industrial spoilage, the biofilm-forming strains could be found and its ability to produce biofilm could also be affected by materials and temperature.

Keywords: *Citrobacter werkmanii*, Identification, SEM, Biofilm, Temperature

细菌生物膜(Biofilm, BF)是细菌黏附在载体的表面,并聚集在由自身分泌的水合基质体中而形成的一层薄膜,除了细菌本身以外还包括细胞分泌的大量胞外基质(Extracellular polymeric substances, EPS),其中含有一些生物大分子如糖类、蛋白质、胞外 DNA、RNA 等^[1-3],为嵌入的细菌提供结构支持和保护功能^[4]。生物膜的形成是一个动态过程,主要包括以下 4 个阶段:黏附定殖阶段、发展阶段、成熟阶段和细菌的脱落与再殖阶段^[5]。生物膜的产生是细菌产生耐药或抗药性的主要因素之一^[6],因抗药性问题的产生,导致许多工业产品,例如洗涤剂、化妆品、胶黏剂等,颜色变化、有异味、甚至腐败变质,给工业生产带来严重的经济损失,但对于其中的各种机制仍然不明朗^[7]。

从工业腐败物中分离和鉴定高产生物膜菌株,并进行产膜特性的研究,将有利于掌握工业防腐失败产品中菌种类及特性,并探明工业产品防霉抗菌体系失败的原因,最终建立新的更有效的防治体系。基于此,本实验室于 2007 年开始从华南、华中等地区化工厂和日化企业中搜集腐败变质样品,并分离到若干株产细菌生物膜能力较强的菌株。本研究选取其中一株菌株进行了表型特征、生理生化、系统发育以及产膜特性等的分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 华南、华中等地区化工厂和日化企业腐败变质硅溶胶和黏合剂样品。

1.1.2 培养基: 胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA, g/L): 胰蛋白胨 15, 大豆蛋白胨 5, 氯化钠 5, 琼脂 15, pH 为 7.3±0.2; M9 培养基(g/L): 葡萄糖 3.6,

Na₂HPO₄ 17.1, KH₂PO₄ 5, NH₄Cl 10, NaCl 0.50, MgSO₄ 0.24, CaCl₂ 0.22; LB 培养基(g/L): NaCl 10, 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5 (OXOID, England)。

1.1.3 主要仪器和培养板: 扫描电子显微镜(H-3000N, Hitachi)、紫外分光光度计(Ultrospec 6300 pro, General Electric)、PCR 仪(Mastercycler 5333, Eppendorf)、化学发光/荧光凝胶成像仪(Image Quant350, General Electric)、台式微量离心机(5415D, Eppendorf)、光学显微镜(DM LB2, Leica)、全波长读数(酶标)仪(Multiskan GO, Thermo)、96 孔细胞培养板(NuncloTMΔ Surface, Danmark)、24 孔细胞培养板(NY 14831, Corning)。

1.2 方法

1.2.1 工业腐败细菌的分离纯化: 将污染样品用无菌水梯度稀释后,涂布在 TSA 培养基上,37 °C 培养 3 d,挑取不同形态的单菌落进行平板划线再次分离,直至在显微镜下观察到的菌体形态一致,并用终浓度为 30%甘油保存菌种。

1.2.2 产 BF 菌株的初步筛选: 将分离得到的细菌菌液以 2.5%的接种量接种至装有 200 μL 的无菌 LB 培养基的 96 孔细胞培养板中,重复 3 个平行并设置空白对照组,37 °C 静置培养 2 d 后,采用微孔板结晶紫染色法^[6,8]筛选产生物膜菌株,具体步骤如下:吸去浮游菌液,用无菌水洗板孔 3 次,200 μL 1%的结晶紫染色液静置室温染色 45 min,吸去结晶紫染色液,再用无菌水清洗板孔 3 次以去除多余的结晶紫,室温干燥 10 min 后,200 μL 95%的乙醇脱色 30 min,全波长读数仪测其吸光光度值(OD₅₉₅)。

1.2.3 BF 菌株形态学观察和生理生化特征: 采用肉眼观察产生物膜细菌在 LB 固体培养基上的菌落

形态、颜色等；经过革兰氏染色后，在光学显微镜下观察和拍照。菌株生理生化实验采用 API20E 鉴定系统并结合《一般细菌常用鉴定方法》^[9]与“Bergey's manual of systematic bacteriology”^[10]，判断生理生化反应类型；氧化酶实验参照《常见细菌鉴定手册》^[11]。

1.2.4 菌株分子生物学鉴定^[12]：接种产 BF 菌株于 LB 液体培养基中，30 °C 培养 24 h 后离心收集菌体，参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根，北京)使用说明提取细菌基因组总 DNA，采用 16S rRNA 通用引物(上游引物 27F：5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3'；下游引物 1429R：5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')和 50 μ L 反应体系进行 PCR 反应扩增，具体的体系如下：10 \times PCR Buffer 5 μ L，dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L，上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L，rTaq DNA 聚合酶(5 U/ μ L；TaKaRa，大连) 0.25 μ L，DNA 模板 1 μ L，ddH₂O 补平至 50 μ L；PCR 扩增参数设置：94 °C 4 min；94 °C 30 s，58 °C 30 s，72 °C 1.5 min，共 35 个循环；72 °C 7 min。扩增产物送至华大基因(广州)进行测序。测序结果与 GenBank 核酸序列数据库中的序列进行同源性比对，对检索出的相似性较高的序列采用 ClustalX 1.83、MEGA 4.0 软件分别进行多序列匹配排列(Multiple alignments)和系统进化树的构建(邻接法 Neighbor-Joining method)。

1.2.5 BF 的扫描电子显微镜观察：将已培养 24 h 的菌液用无菌 LB 培养基稀释至 OD₆₀₀ 为 0.1 后备用，将已灭菌的 3 种常见工业材料：不锈钢片(3 mm \times 10 mm)、玻璃片(8 mm \times 8 mm)和 PVC 片(10 mm \times 10 mm)依次放入 24 孔细胞培养板中，每孔加入稀释后菌悬液 2 mL，37 °C 连续静置培养 4 d，隔日更换生理盐水，每种材料设 2 个平行^[13]；培养后的材料经 3%戊二醛固定，乙醇梯度脱水，叔丁醇置换，冷冻干燥后，样品贴台、溅射喷金，再在扫描电镜下观察和拍照。

1.2.6 温度对菌株产 BF 的影响：采用改良微孔板法研究温度对菌株产细菌生物膜的影响，取 4 块 24 孔细胞培养板，将已灭菌的 3 种工业常见材料：

不锈钢片(3 mm \times 10 mm)、玻璃片(8 mm \times 8 mm)和 PVC 片(10 mm \times 10 mm)依次置于装有 2 mL 无菌 LB 培养基的 24 孔细胞培养板中，按 2.5%的接种量接入菌悬液，每种材料设置 3 个重复，并设置不加菌液空白对照组，每块培养板操作相同；将 4 块 24 孔细胞培养板分别放置于 24、30、37 和 42 °C 环境下静置培养 2 d 后，采用结晶紫染色法观察生物膜形成情况，除结晶紫染色液和 95%乙醇各 2 mL，其他步骤如 1.2.2 所述。

1.2.7 数据处理：不同材料在不同温度下的数据，应用 SPSS 13.0 软件进行处理，单因素方差分析法比较判断组间差异，采用 LSD 法进行两两比较。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态学特征

经富集、分离、纯化培养后，筛选出产膜菌种数株，选取其中一株进行后续研究(其它各菌株产膜数据未列出)。观察表明，该菌株在 LB 固体培养基上乳白色、不透明、菌落正反面颜色一致，近似圆形，表面光滑，边缘整齐，为革兰氏阴性长杆菌，如图 1 所示。

2.2 菌株生理生化特征

生理生化实验结果见表 1，实验结果经 APILAB Plus 软件分析，结合“Bergey's manual of systematic bacteriology”，初步鉴定此菌为肠杆菌科柠檬酸杆菌属的魏氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter werkmanii*)。

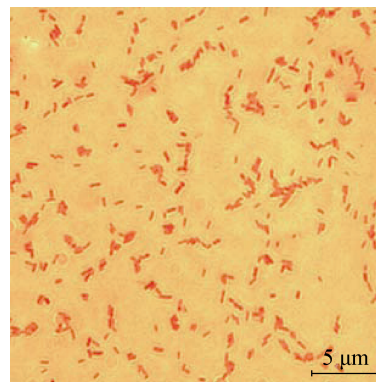


图 1 菌株革兰氏染色图

Figure 1 Gram stain of selected strain

表 1 菌株生理生化鉴定结果
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of isolated strain

特性 Characteristics	分离菌 Isolate	魏氏柠檬酸杆菌 <i>C. werkmanii</i>
β-半乳糖苷酶 ONGP	+	+
精氨酸双水解酶 Arginine double hydrolytic enzyme	+	+
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	—	—
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	—	—
柠檬酸盐 Citrate (Simmons)	+	+
硫化氢产生 H ₂ S production	+	+
脲酶 Urease	+	+
色氨酸脱氨酶 Tryptophan dehydrogenase	—	—
吲哚产生 Indole	—	—
3-羟基丁酮产生乙酰甲基甲醇 Voges-Proskauer	—	—
明胶酶 Gelatinase	—	—
葡萄糖 Glucose	+	+
甘露醇 Mannitol	+	+
肌醇 Inositol	—	—
山梨醇 Sorbitol	+	+
鼠李糖 Rhamnose	+	+
蔗糖 Sucrose	—	—
蜜二糖 Melibiose	—	—
苦杏仁甙 Amygdalin	—	—
阿拉伯糖 Arabinose	+	+
细胞色素氧化酶 Oxidase	—	—
3-羟基苯甲酸甲酯 3-Hydroxybenzoate	+	+
丙二酸盐 Malonate	+	+

注：+：阳性；—：阴性。

Note: +: Positive; —: Negative.

2.3 菌株分子生物学鉴定

分离菌所扩增的 16S rRNA 基因序列长度为 1 438 bp，GenBank 登录号为：KC489166，将此菌株的 16S rRNA 基因测序结果通过 BLASTn 进行序列同源性分析表明，菌株与柠檬酸杆菌属细菌的 16S rRNA 相似性最高，该菌株与 *Citrobacter werkmanii* CDC 0876-58 (NR_024862)碱基相似性达 99.51%，选取柠檬酸杆菌属 9 种菌进行系统发育分析，结果见图 2。综合生理生化和分子生物学鉴定结果，将此分离菌命名为 *Citrobacter werkmanii* BF-6。

2.4 扫描电子显微镜观察生物膜

通过扫描电子显微镜观察，如图 3 所示，菌株

BF-6 在 3 种不同材料表面：不锈钢片、玻璃片和 PVC 表面都具有形成生物膜的能力，但不锈钢片和玻璃片上的生物膜呈现局部区域的聚集，而在 PVC 上，菌体分布最为均匀，形成的生物膜较为分散。

2.5 温度对生物膜在不同材料表面形成的影响

分离菌株 BF-6 在不锈钢、玻璃、PVC 表面均能形成生物膜，为了评价温度对产膜的影响，利用结晶紫染色的方法以单位面积(cm²)上的吸光光度值(OD₅₉₅)作为指标，研究 BF-6 在不同材料和不同温度(24、30、37、42 °C)下形成生物膜德的能力，结果如图 4 所示。同种材料之间，在 24、30、37、42 °C 环境温度下产生物膜情况都具有极显著差异

($P < 0.01$), 培养温度为 30 °C 时菌株 BF-6 单位面积产生物膜能力最强。同一环境温度条件下, 在 PVC 材料表面的产生物膜能力明显优于其他两种材料, 在玻璃材料表面产生物膜能力最差。

3 讨论

魏氏柠檬酸杆菌, 为纪念美国细菌学家 Chester H. Werkman 而得名, 革兰氏阴性菌, 通过周生鞭毛运动, 能够利用 L-阿拉伯糖、麦芽糖、鼠李糖、海藻糖、D-木糖、D-甘露糖和 D-山梨糖醇等为单一碳源, 并且丙二酸盐和间羟基苯酸酸盐反应为阳性, 该菌株为兼性厌氧性菌株, 最佳生长温度为 37 °C^[10]。本研究中所分离的 BF-6, 具有典

型的魏氏柠檬酸杆菌的特征(表 1), 并经分子进化分析(图 2), 也证实了这个判断。

研究已经证实, 包括材料和温度在内的众多外界环境条件均会影响细菌生物膜的产生、发展和结构^[14-16]。本研究中分离的菌株 BF-6 在 3 种工业材料玻璃片、不锈钢片和 PVC 表面均能产生物膜(图 3), 而且产膜的能力受温度和附着材料的影响(图 4), 并具显著的差异性, 造成这样现象的原因可能与材料表面物理化学性质有关, 如表面粗糙度、电荷、微孔特性和比表面积等, 从而导致生物膜在不同材料表面的黏附能力不同。用粒径相同的粒状活性炭(GCA)、无烟煤和砂 3 种填料进行表面

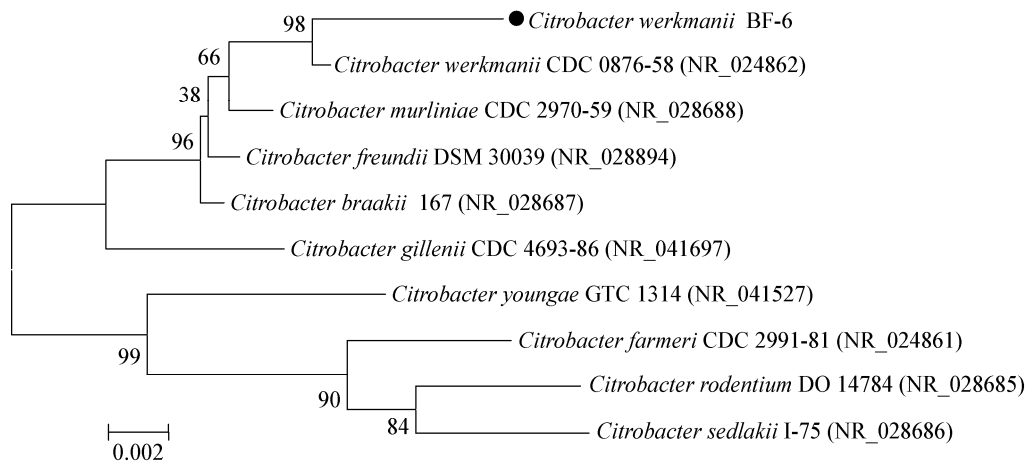


图 2 依据 16S rRNA 基因序列构建的菌株 BF-6 和相关属菌种的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of BF-6 and related bacterial species

Note: Phylogenetic tree was constructed by the bootstrapping and Neighbor-Joining method with MEGA 4.0 software.

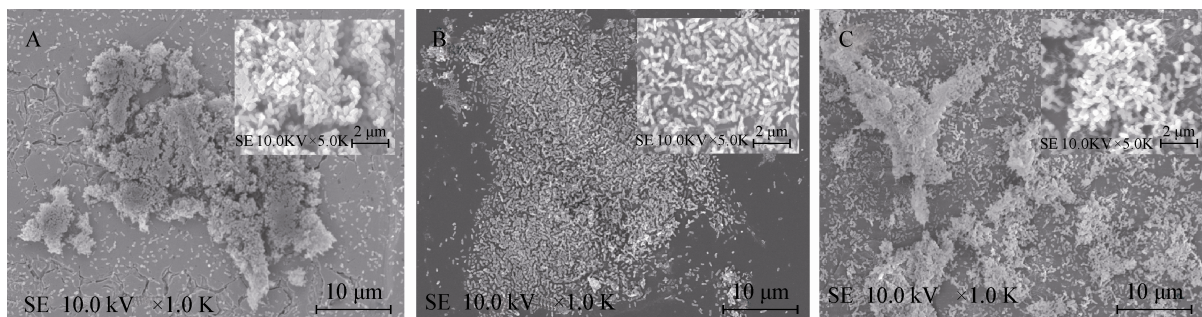


图 3 菌株 BF-6 在不锈钢片(A)、玻璃片(B)、PVC (C)表面形成生物膜扫描电子显微镜图

Figure 3 SEM of biofilm formation by BF-6 on the surface of stainless steel (A), glass (B) and PVC (C)

注: 大图放大 1 000 倍, Bar: 10 μm; 小图是局部放大图, 放大倍数 5 000 倍, Bar: 2 μm.

Note: Big picture: 1 000× magnification, bar: 10 μm; Small picture: 5 000× magnification, bar: 2 μm.

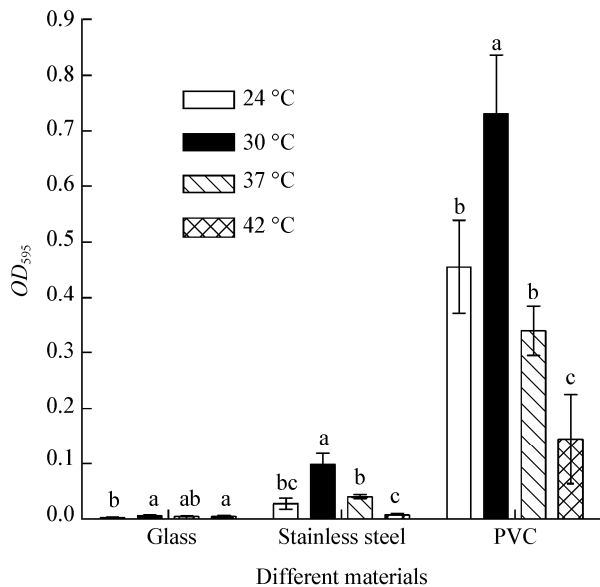


图4 不同温度条件下菌株BF-6在玻璃、不锈钢和PVC材料表面单位面积生物膜吸收值

Figure 4 Absorbance data per cm² for BF-6 grown on the surface of glass, stainless steel and PVC

注：柱上字母表示组间显著性水平(a>b>c).

Note: The letters above column show the level of significance (a>b>c).

粗糙度与生物膜形成关系实验，结果表明表面最粗糙的GCA所附着的生物量为另外两种材料的3–10倍^[17]；同时有研究表明，附着的物理材料可能有一个最佳的粗糙度指数，从而最高限量的减少细菌黏附^[18]；因此需要进一步研究证明材料表面物理化学性质与细菌黏附、生物膜形成之间的关系^[19]；同时，温度也会影响菌株的生长，关于菌株生长速度和产生物膜水平之间的联系也需要进一步的研究^[20]。

参 考 文 献

- [1] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms[J]. The Lancet, 2001, 358(9276): 135-138.
- [2] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [3] Pitrea MC, Correia PM, Mankowski PJ, et al. Biofilm growth in human skeletal material from ancient Mesopotamia[J]. Journal of Archaeological Science, 2013, 40(1): 24-29.
- [4] Stoodley P, Sauer K, Davies DG, et al. Biofilms as complex differentiated communities[J]. Annual Review of

Microbiology, 2002, 56: 187-209.

- [5] Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2010, 35(4): 322-332.
- [6] Bridier A, Briandet R, Thomas V, et al. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review[J]. Biofouling, 2011, 27(9): 1017-1032.
- [7] 王春华, 谢小保, 曾海燕, 等. 微生物对工业杀菌剂的抗药性研究进展[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 791-794.
- [8] Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(6): 2950-2958.
- [9] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常见鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 180-185.
- [10] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. Second Edition, Vol. 2, The Proteobacteria. New York: Springer, 2004: 651-656.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 370.
- [12] 陈德富, 陈喜文. 现代分子生物学实验原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 8-187.
- [13] Hamanaka D, Onishi M, Genkawa T, et al. Effects of temperature and nutrient concentration on the structural characteristics and removal of vegetable-associated *Pseudomonas* biofilm[J]. Food Control, 2012, 24(1/2): 165-170.
- [14] Lebeer S, Verhoeven TLA, Perea Vélez M, et al. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6768-6785.
- [15] Pan Y, Breidt FJR, Gorski L. Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(5): 1433-1441.
- [16] Shukla SK, Rao TS. Effect of calcium on *Staphylococcus aureus* biofilm architecture: A confocal laser scanning microscopic study[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2013, 103: 448-454.
- [17] 方芳, 龙腾锐, 郭劲松, 等. 多孔填料表面物理特性对生物膜附着的影响[J]. 工业用水和废水, 2004, 35(6): 1-4.
- [18] Renner LD, Weibel DB. Physicochemical regulation of biofilm formation[J]. MRS Bulletin, 2011, 36(5): 347-355.
- [19] Apilánez I, Gutierrez A, Dfaz M. Effect of surface materials on initial biofilm development[J]. Bioresource Technology, 1998, 66(3): 225-230.
- [20] Villanueva VD, Font J, Schwartz T, et al. Biofilm formation at warming temperature: acceleration of microbial colonization and microbial interactive effects[J]. Biofouling, 2011, 27(1): 59-71.