

环境因子对水霉菌生物膜形成的影响

袁海兰 苏建 胡鲲 曹海鹏 杨先乐*

(上海海洋大学 国家水生动物病原库 上海 201306)

摘要:【目的】体外构建水霉菌(*Saprolegnia*)生物膜(Biofilm, BF), 研究环境因子对其生物膜形成的影响。【方法】采用改良的微孔板法研究静置培养条件下寄生水霉(*Saprolegnia parasitica*) ATCC200013 在 96 孔酶标板上的成膜情况, CCK-8 法(Cell Counting Kit-8)定量检测生物膜中水霉菌的活力。【结果】水霉菌的生物膜的 OD_{450} 值在培养 24 h 达到峰值, 48 h 后趋于稳定。随着初始孢子浓度升高, 水霉菌生物膜 OD_{450} 值升高, 差异显著($P<0.05$)。20–25 °C 生物膜形成量最多, OD_{450} 值显著高于其他温度组($P<0.05$)。在起始 pH 值为 4–11 的沙氏葡萄糖液体培养基中, 水霉菌均能形成生物膜。在培养基中加入 0.12 mmol/L 以上 $CaCl_2$, 能促进生物膜形成; 添加 0.03–2.00 mmol/L $MgCl_2$, 水霉菌生物膜形成量与未添加 $MgCl_2$ 对照组无显著性差异; Cu^{2+} 对水霉菌生物膜的形成有显著影响, 0.5 mmol/L 以上添加处理几乎不形成生物膜; NaCl 能明显抑制水霉菌生物膜的形成, 当 NaCl 质量分数低于 0.12% 时, 对生物膜形成的影响较小($P>0.05$)。水霉菌在鲫鱼皮和肌肉提取液包被后生物膜形成量与对照组相比无显著性差异, 而鲫鱼表皮黏液、鳃黏液包被后生物膜的形成量明显减少。【结论】研究首次采用微孔板法体外构建水霉菌生物膜, 发现其生物膜的形成与多种环境因素有着密切的关系。这为了解水霉菌生物膜的形成规律提供了一定参考, 为水霉菌生物膜的进一步研究奠定了基础。

关键词: 水霉菌, 生物膜, 环境因子

Effects of environmental factors on biofilm formation of *Saprolegnia*

YUAN Hai-Lan SU Jian HU Kun CAO Hai-Peng YANG Xian-Le*

(State Collection Center of Aquatic Pathogen, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: [Objective] Biofilm of *Saprolegnia* was developed *in vitro* and the effects of the environmental factors were studied. [Methods] The characteristics of biofilm formation of *Saprolegnia parasitica* ATCC200013 were investigated by modified microtiter-plate test, and the viability of *Saprolegnia* in the biofilms was detected by CCK-8. [Results] The OD_{450} value of *Saprolegnia* biofilm reached the peak after 24 h and stabilized after 48 h. OD_{450} value of biofilm significantly elevated with densities of initial *Saprolegnia* spores ($P<0.05$). The largest biofilm quantity was at 20 °C and 25 °C, which were significantly higher than the others ($P<0.05$).

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA10A216); 上海市科技兴农重点攻关项目(No. 沪农科攻字(2011)第 4-8 号); 国家水产种质资源平台运行服务项目; 上海高校知识服务平台资助

*通讯作者: ✉: xlyang@shfu.edu.cn

收稿日期: 2013-11-01; 接受日期: 2014-01-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-09

Saprolegnia can develop biofilm at initial pH between 4 and 11. When more than 0.12 mmol/L CaCl_2 was added, biofilm formation of *Saprolegnia* was promoted. However, it played no significant role when 0.03 to 2.00 mmol/L MgCl_2 was added. Cu^{2+} significantly affected the biofilm formation, while no evident biofilm was found when more than 0.5 mmol/L was added. Additionally, the biofilm formation was significantly inhibited by NaCl, but it played no significant role when less than 0.12% was added ($P>0.05$). Compared with the control group, the biofilms developed on the surface of the microtiter plate coated by the extract of skin or muscle showed no remarkable difference, while the biofilms on the microtiter plate coated by skin or gill mucus decreased. **[Conclusion]** A new method to form and measure *Saprolegnia* biofilm is successfully established. It describes for the first time that *Saprolegnia* biofilm formation can be affected by different environmental factors, which is beneficial to understand the growth of *Saprolegnia* biofilm and study further.

Keywords: *Saprolegnia*, Biofilm, Environmental factors

生物膜(Biofilm, BF)是一种附着于生物或非生物表面的、包裹着由其自身产生的细胞外多聚基质(Extracellular matrix, ECM)、有三维结构的菌细胞群体,是细菌、真菌在生长过程中为适应生存环境而形成的一种与浮游细胞相对应的生存方式^[1]。微生物采用特殊的生理机能,构成生物膜形成自我保护的环境。生物膜的主要特点是可明显降低对抗菌药物的敏感性,甚至产生耐药。生物膜的特性决定了生物膜一旦建立,杀灭这种细胞就极为困难,也正是生物膜的存在,使抗生素疗效大打折扣。生物膜已经成为当今医学微生物学领域的一个研究热点^[2]。

水霉菌(*Saprolegnia*)是鱼类真菌性疾病的主要病原,在淡水水域中广泛存在,对温度的适应范围广,一年四季都可发生^[3]。水霉菌一般通过菌丝和孢子感染鱼体和鱼卵,且对水产动物的种类没有选择性,给水产养殖业带来严重损失。水霉菌造成的巨大危害引起了有关学者对其致病机理的关注。Ali 等^[4]于 2013 年首次报道水霉菌可以形成生物膜,水霉菌能够在生物膜中存活、生长和繁殖,并对水产动物构成持续不断的感染。目前,国内外有关水霉菌生物膜形成的影响因素的研究未见报道,对生物膜形成规律的研究是探讨生物膜致病性的重要基础^[5]。本文通过改良的微孔板法体外构建水霉菌生物膜,探讨不同环境因子对水霉菌生物膜形成的影响,以期了解不同环境条件下的水霉菌生物膜形成规律。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 水霉菌株,寄生水霉(*Saprolegnia parasitica*) ATCC200013 (1990 年,分离自日本神奈川患水霉病的虹鳟),购自美国典型微生物菌种保藏中心(ATCC)。

1.1.2 试剂: 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA),国药集团化学有限公司;沙氏葡萄糖液体培养基,杭州天和微生物试剂有限公司;考马斯亮蓝 G-250,国药集团化学试剂有限公司;细胞计数试剂盒 CCK-8 (Cell Counting Kit-8),碧云天生物技术研究。

1.1.3 仪器: 96 孔酶标板(Corning-3590),国药集团化学有限公司;酶标仪, Microplate Autoreader EL311。

1.2 方法

1.2.1 水霉菌孢子悬液的制备: 菌种接种在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平皿上,20 °C 将菌种活化^[6]。然后在平皿上铺满油菜籽,待菌丝长上菜籽,将菜籽移至灭菌蒸馏水中。20 °C 培养 48 h,待游动孢子大量产生后,用 3 层灭菌纱布过滤弃去油菜籽,离心收集水霉菌孢子,血球计数板计数,将孢子浓度调至 2×10^6 个/mL。

1.2.2 水霉菌生物膜的形成: 体外生物膜形成参照 Stepanovic 等的微孔板法^[7]并进行适当改进,具体步骤如下:吸取 100 μL 新鲜沙氏葡萄糖液体培养基加入到 96 孔酶标板小孔中,再加入 100 μL 2×10^6 个/mL

水霉菌孢子悬液, 20 °C 湿盒中静置培养 60 h 后, 吸出多余的培养基, 并用 250 μ L 灭菌 PBS 清洗 3 次以去除游离菌。实验重复 3 次。

1.2.3 水霉菌生物膜形成量的测定: 按照试剂盒的说明使用 CCK-8 工作液。形成的水霉菌生物膜洗涤后, 每孔分别加入 100 μ L 沙氏葡萄糖液体培养基和 10 μ L CCK-8 工作液, 放入 28 °C 恒温孵箱中培养 3 h 后用酶标仪测定每孔在 450 nm 处的吸光值。实际吸光值为每个实验孔的吸光值减去空白对照孔的吸光值。

(1) 培养时间对水霉菌生物膜形成的影响: 按 1.2.2 水霉菌生物膜形成方法, 测定 0、6、12、24、36、48、60、72 h 形成的生物膜的 OD_{450} 值。

(2) 初始孢子浓度对水霉菌生物膜形成的影响: 将水霉菌孢子浓度调至 2.0×10^6 个/mL, 然后进行 10 倍系列稀释, 按 1.2.2 水霉菌生物膜形成方法, 分别得到 1.0×10^6 、 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 个/mL 的孢子悬液, 测定不同初始水霉菌孢子浓度所形成的生物膜的 OD_{450} 值。

(3) 培养温度对水霉菌生物膜形成的影响: 将水霉菌置于 4、15、20、25、28、32、40 °C 培养, 测定不同培养温度所形成的生物膜的 OD_{450} 值。

(4) pH 值对水霉菌生物膜形成的影响: 配制 pH 值分别为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 的沙氏葡萄糖液体培养基, 测定不同 pH 值条件下形成的生物膜的 OD_{450} 值。

(5) Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、NaCl 对水霉菌生物膜形成的影响: 分别向沙氏葡萄糖液体培养基中添加 $CaCl_2$ 、 $MgCl_2$ 、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 至终浓度为 2.00、1.00、0.50、0.25、0.12、0.06、0.03 mmol/L; 添加 NaCl 至终浓度为 4.00%、3.00%、2.00%、1.00%、0.50%、0.25%、0.12%、0.06%。测定 $CaCl_2$ 、 $MgCl_2$ 、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、NaCl 所形成的生物膜的 OD_{450} 值。以不添加 $CaCl_2$ 、 $MgCl_2$ 、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、NaCl 的沙氏葡萄糖液体培养基为阴性对照。

(6) 不同黏液和组织提取液包被对水霉菌生物膜形成的影响: 制备鲫表皮黏液、鳃黏液及皮提

取液、肌肉提取液, 参考 Chen 等^[8]方法。并采用考马斯亮蓝法将蛋白质含量调至 1 g/L, 然后依次用 0.45 μ L 和 0.22 μ L 微孔滤膜过滤除菌, 置于 4 °C 待用。

在 96 孔酶标板各孔分别加入 200 μ L 制备的鲫表皮黏液、鳃黏液和皮、肌肉提取液, 4 °C 包被 10 h 后弃去, 用 250 μ L PBS 清洗 2 次后, 按 1.2.2 水霉菌生物膜形成方法, 测定黏液和不同组织提取液包被后形成的生物膜的 OD_{450} 值。以未经包被的酶标板为阴性对照。

1.3 数据处理

结果以平均数加或减标准偏差表示, 用 Excel、SPSS 13.0 软件进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 培养时间对水霉菌生物膜形成的影响

如图 1 所示, 在培养初期, 水霉菌所形成的生物膜 OD_{450} 随着培养时间的延长而增加, 约 24 h 达到峰值。继续培养至 48 h 生物膜 OD_{450} 值有所下降。48 h 后趋于稳定。

2.2 初始孢子浓度对水霉菌生物膜形成的影响

水霉菌初始孢子浓度为 10^1 – 10^4 个/mL 时, 培养 60 h 后所形成的生物膜 OD_{450} 值随着初始孢子浓度增加而增加, 差异显著 ($P < 0.05$), 10^5 个/mL 与 10^4 个/mL 生物膜形成量 OD_{450} 值无显著性差异 (图 2)。

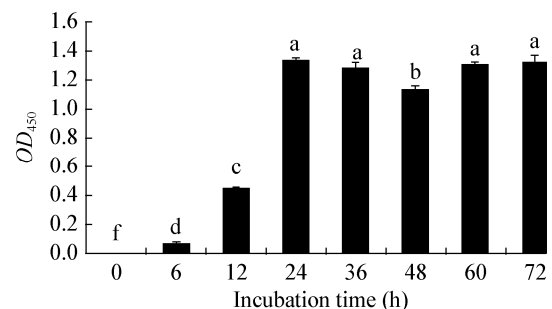


图 1 不同培养时间水霉菌形成的生物膜的 OD_{450} 值

Figure 1 OD_{450} values of *Saprolegnia* biofilms of different incubation times

注: 不同字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$).

Note: Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

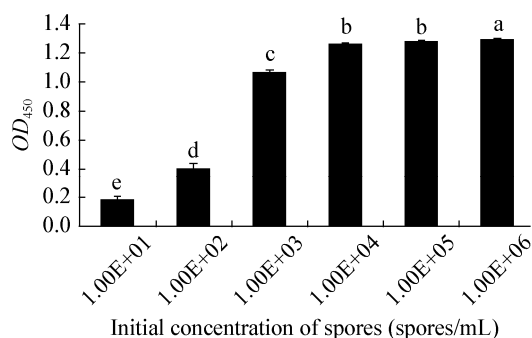


图2 不同初始孢子浓度水霉菌形成的生物膜的 OD_{450} 值
Figure 2 OD_{450} values of *Saprolegnia* biofilms of different initial concentration of spores

注：不同字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

2.3 培养温度对水霉菌生物膜形成的影响

如图3所示,在4–25 °C 范围内。随温度升高,生物膜的形成量逐渐增多。28 °C 较 25 °C 生物膜形成量显著下降 ($P < 0.05$)。当温度达到 32 °C 时,生物膜形成量极少,40 °C 水霉菌几乎不形成生物膜。

2.4 初始 pH 对水霉菌生物膜形成的影响

培养液初始 pH 为 3 和 12 时,水霉菌几乎不形成的生物膜;pH 升到 4–7 时, OD_{450} 值随之显著增大,且 pH 为 7 时 OD_{450} 值最大;pH 8–11 时, OD_{450} 值显著下降 ($P < 0.05$, 图4)。

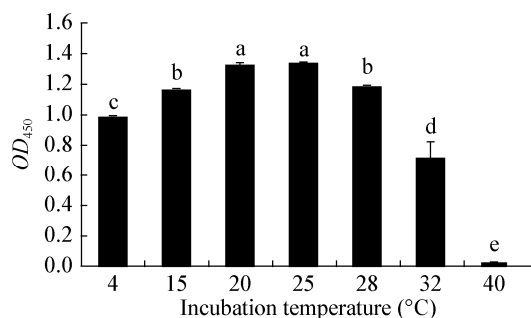


图3 不同温度水霉菌形成的生物膜的 OD_{450} 值
Figure 3 OD_{450} values of *Saprolegnia* biofilms of different incubation temperature

注：不同字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

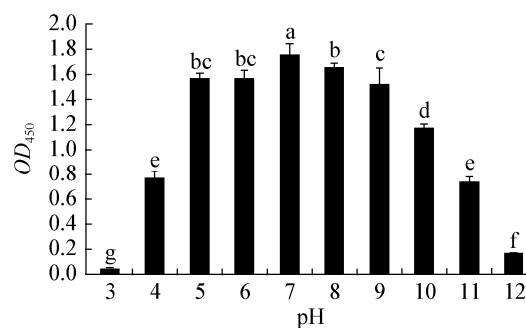


图4 水霉菌在不同 pH 值条件下形成的生物膜的 OD_{450} 值
Figure 4 OD_{450} values of *Saprolegnia* biofilms developed at different pH values

注：不同字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

2.5 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、NaCl 对水霉菌生物膜形成的影响

如图5所示,当培养基添加 0.12 mmol/L 以上 Ca^{2+} ,水霉菌形成的生物膜的 OD_{450} 值显著高于对照组 ($P < 0.05$)。图6显示,添加 0.03–2.00 mmol/L 氯化镁,试验组水霉菌生物膜形成量 OD_{450} 值有所增加,但与对照组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

图7显示 Cu^{2+} 浓度对水霉菌生物膜的形成有显著影响, Cu^{2+} 浓度为 1 mmol/L 或 2 mmol/L 时,几乎不能形成生物膜,其他添加组也显著低于对照组生物膜形成量,0.12、0.25、0.50 mmol/L 三组之

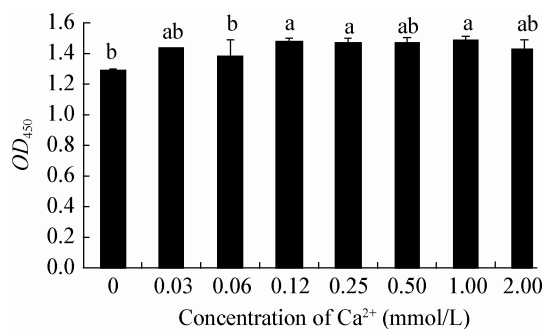


图5 水霉菌在添加不同浓度 Ca^{2+} 条件下形成的生物膜的 OD_{450}

Figure 5 OD_{450} values of *Saprolegnia* biofilms developed under different concentration of Ca^{2+}

注：不同字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

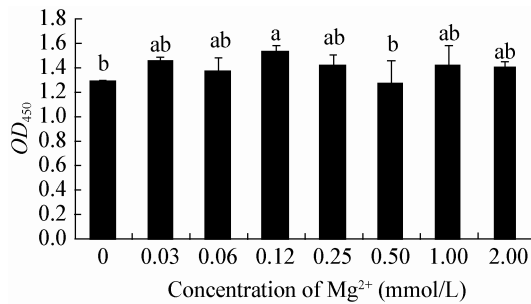


图 6 水霉菌在添加不同浓度 Mg^{2+} 条件下形成的生物膜的 OD_{450}

Figure 6 OD_{450} values of *Saprolegnia* biofilms developed under different concentration of Mg^{2+}

注: 不同字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$).

Note: Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

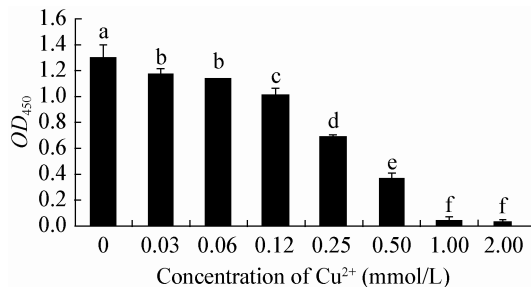


图 7 水霉菌在添加不同浓度 Cu^{2+} 条件下形成的生物膜的 OD_{450}

Figure 7 OD_{450} values of *Saprolegnia* biofilms developed under different concentration of Cu^{2+}

注: 不同字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$).

Note: Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

间生物膜形成量差异显著 ($P < 0.05$), 0.03 mmol/L 与 0.06 mmol/L 差异不显著 ($P > 0.05$).

在一定质量分数范围内, NaCl 对水霉菌的生物膜形成有显著影响。当 NaCl 质量分数为 3%、4% 时, 水霉菌生物膜的形明显受到抑制, 几乎不形成生物膜; 2% 添加组有极少量形成; 继续减少 NaCl 添加量, 1.00%、0.50%、0.25% 组水霉菌生物膜明显增多, 但仍与对照组存在显著性差异 ($P < 0.05$); 0.12% 与 0.06% 组生物膜形成量与对照组差异不显著 ($P > 0.05$, 图 8)。

2.6 鲫不同黏液和组织提取液对水霉菌生物膜形成的影响

如图 9 所示, 与对照组相比, 水霉菌在鲫鱼皮提取液和肌肉提取液包被的 96 孔酶标板上生物膜形成量不存在显著差异 ($P > 0.05$), 而水霉菌在鲫鱼表皮黏液、鳃黏液包被的 96 孔酶标板上生物膜的形成量显著减少 ($P < 0.05$)。

3 讨论

目前定量检测微生物生物膜的方法主要有染色法、活菌计数、MTT 法^[5]。染色法主要是结晶

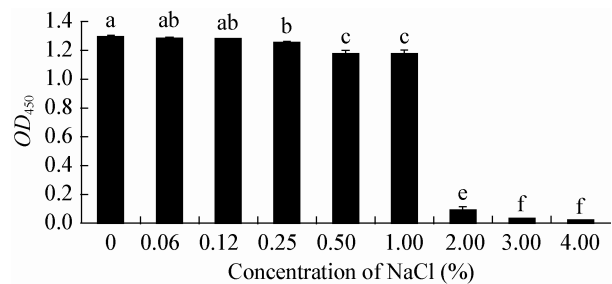


图 8 水霉菌在添加不同浓度 NaCl 条件下形成的生物膜的 OD_{450}

Figure 8 OD_{450} values of *Saprolegnia* biofilms developed under different concentration of NaCl

注: 不同字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$).

Note: Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

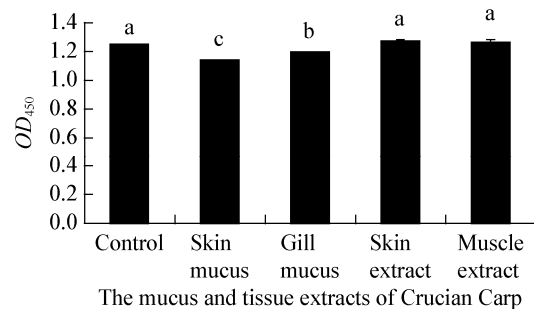


图 9 水霉菌在不同基质上形成生物膜的 OD_{450}

Figure 9 OD_{450} values of *Saprolegnia* biofilms developed on different matrix

注: 不同字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$).

Note: Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

紫染色,它可以对生物膜的总量进行测定,但是无法反映 BF 内菌细胞的活力情况。活菌计数前提是需要把 BF 从载体上分离下来,分离的过程会破坏生物膜,且不能完全分离,过程繁琐。MTT 广泛用于细胞活力测定,但经 MTT 还原所产生的产物甲瓞不溶于水,无法直接测定吸光度,需要被溶解之后才能检测。这不仅使工作量增加,且易造成误差。用于细胞活力测定的 MTT 类似物还有 XTT、MTS、WST-1、CKK-8。其中,CKK-8 法是近年来研发的一种新型检测方法,不仅生成的甲瓞物具有高度水溶性,不需要使用裂解液溶解沉淀,且操作最简便,灵敏度、准确性和重复性均更好^[9]。

真菌的生物膜形成过程不尽相同,但大致可分为几个步骤:(1) 菌体黏附至合适的底物。(2) 形成微菌落,微菌落融合并形成生物膜的基底层。(3) 产生细胞外基质,逐渐成熟形成三维立体结构。(4) 生物膜子代细胞的播散。李丽娟等^[10]研究了烟曲霉生物膜的形成过程和结构特征。发现烟曲霉生物膜的形成过程为孢子黏附(4 h),孢子萌芽(8 h),菌丝延长相互连接形成单细胞层(10–12 h),菌丝缠绕形成多层立体结构(16–20 h),最后形成菌丝有序排列、具有复杂的三维立体结构特征的多细胞菌落。本研究结果显示,水霉菌的生物膜形成情况为:0–12 h 为早期黏附阶段,主要是培养液中的孢子黏附于酶标板表面,孢子萌发,导致酶标板表面的微生物生物量逐步增加;12–24 h 水霉菌生物膜 OD_{450} 值快速增加,表示生物膜内的活菌数不断增多,代谢旺盛,是生物膜内生物量增殖的重要阶段;24–48 h 生物膜形成量呈短暂的降低趋势,可能是菌细胞大量繁殖,营养受到限制;48–72 h 为生物膜成熟阶段,生物膜 OD_{450} 值趋于稳定。Harding 等^[11]指出成熟的生物膜会释放大量孢子,完成新的周期。本试验水霉菌在聚苯乙烯材料的 96 孔酶标板表面形成明显的生物膜,但是黏附并不十分稳固。微生物黏附固相表面是生物膜形成的第一步,黏附性能影响微生物的分散或聚集状态^[12]。疏水蛋白参与菌丝黏附在疏水界面,Pater 指出疏水性

念珠菌菌株较亲水性菌株更易形成生物膜。许多因素可以影响真菌生物膜的形成^[13],不同材料上形成的真菌的生物膜量也不同,Luis 等发现新型隐球菌黏附和形成生物膜的能力,聚乙烯>玻璃>聚苯乙烯>聚碳酸酯。

本试验结果表明,随着水霉菌初始孢子浓度增加,水霉菌生物膜形成量增多。在孢子浓度为 10^1 – 10^2 个/mL 时,由于培养基中孢子数量较少,黏附于酶标板的数量少,生物膜的形成量也较少。同时,生物膜的形成与微生物群体感应系统密切相关,如白色念珠菌孢子相和菌丝相可逆转换受到群体感应系统控制,从而影响白色念珠菌生物膜的形成^[14]。

水霉菌对温度的适应性很广,在不同温度(低温 5.0–7.5 °C,中温 15.5–19.0 °C,高温 21.8–26.0 °C)下进行水霉生长试验,发现温度对它们的生长影响很小,无论在低、中、高温中,第 2 天都能长出菌丝,所不同的是中、高温组生长较快而已。但是温度再高,如在 30 °C 以上则仅适宜某些高温菌种如丝囊霉和腐霉的生长,而不适宜于水霉和绵霉属的某些物种的生长^[15]。本试验结果显示水霉菌低温(4 °C)条件下也能较好地形成生物膜,20–25 °C 生物膜形成量最多,与水霉菌的最适生长温度为 25 °C 基本一致^[16],本试验发现 32 °C 仍能形成少量生物膜。有研究发现,许多微生物在不是最适宜生长的条件下促使生物膜的形成,环境中分离的大肠埃希菌在低于最适生长温度刺激下,产生黏附因子,有利于生物膜的形成^[17]。

Arasaki 等指出寄生水霉最适生长 pH 接近中性^[15]。倪达书用鱼卵为基质,在不同 pH 浓度中观察水霉的生长,发现 pH 7.2 对水霉的生长最佳。其次是 pH 6.4 和 8.0;在 pH 5.6 和 4.8 中,水霉生长完全被抑制。而夏文伟^[6]发现水霉菌在 pH 4–11 范围内均能生长,最适生长 pH 6–9。本试验结果显示在起始 pH 值为 4–11 的沙氏葡萄糖液体培养基中,水霉菌均能形成生物膜,pH 7 和 8 时,水霉菌生物膜形成量最多,pH 3 和 12 几乎不形成生物膜。

已知 Ca^{2+} 参与了真菌菌丝的顶端生长过程,且

Ca^{2+} 在高浓度时促进菌丝顶端生长^[18-19]。真菌菌丝像其它植物极性细胞(如花粉管、根毛等)一样通过顶端生长不断向前伸长, Ca^{2+} 作为第二信使分子参与了菌丝顶端生长的调节过程。 Ca^{2+} 可使许多真菌的生长和繁殖速度加快,在异丝水霉(*Saprolegnia diclina*)培养中添加 Ca^{2+} ,能促进孢子囊的形成^[20]。本结果显示0.12 mmol/L及其以上 Ca^{2+} 能够促进水霉菌生物膜的形成。

镁是真菌需要并起广泛调节作用的无机元素。它的主要功用大约是可使正常代谢和生长所需要的酶活化^[15]。在研究 Mg^{2+} 对黏液性铜绿假单胞菌^[21]、荧光假单胞菌^[22]、嗜水气单胞菌^[23]生物膜的形成作用时,发现 Mg^{2+} 通过对负电荷(细菌多糖及载体)的吸引,既增加菌落间的聚集,又增加了菌落与载体间的黏附。但本研究通过添加0.03–2.00 mmol/L MgCl_2 与未添加 MgCl_2 对照试验,添加 Mg^{2+} 使水霉菌生物膜形成量增多,但与对照组无显著性差异。

本研究结果显示0.03–2.00 mmol/L Cu^{2+} 添加量显著抑制水霉菌生物膜的形成,1 mmol/L和2 mmol/L添加组几乎不形成生物膜。铜是一些真菌酶的金属激活因子,特别是氧化酶。超过适宜浓度的铜对真菌的生长由促进变为抑制,而且是某些的杀真菌剂的关键成分^[20]。张世奇^[24]研究了硫酸铜对水霉菌菌丝的抑制效果,MIC为50 mg/L。刘杏忠等^[25]研究 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 6种重金属离子对水霉菌的毒性,结果表明 Cu^{2+} 的毒性最强,0.1 mg/L时对产孢已有强烈的影响,并且在100 mg/L时对所有供试菌都有致畸作用,使菌丝原生质体浓缩,菌丝顶端聚集成簇。

水霉菌对盐度的反应是很敏感的。倪达书^[15]试出万分之四以上的食盐浓度,就有抑制水霉生长的作用。张书俊等^[16]通过在PDA中添加NaCl测试水霉菌对NaCl的敏感性,发现水霉菌对NaCl敏感,当PDA培养基中NaCl质量分数为1%和2%时,水霉生长抑制率分别为37.4%和75.6%;质量分数大于3%时,生长被完全抑制。本试验中水霉菌在NaCl质量分数2%以上几乎不形成生物膜;

当NaCl质量分数降至0.12%以下时,对水霉菌生物膜的形成影响较小。

水霉菌一般感染淡水鱼类的表皮和鳃部,当鱼体受伤,鱼类肌肉组织会释放高浓度氨基酸,对孢子有巨大的吸引力^[26]。鱼类体表黏液和皮肤都是防御病原直接侵入机体的第一道防护线,据报道,黏液含有大量的溶菌和杀菌物质。Sarah等研究了水霉菌孢子在鲑科鱼类黏液中的存活情况。实验证明水霉菌在黏液中形态异常,将它们重新接种在培养基中,菌丝生长受到抑制且出现非正常菌落。本研究中水霉菌在鲫表皮黏液、鳃黏液包被后生物膜的形成量明显减少,在鲫鱼皮和肌肉提取液包被后生物膜形成量与对照组相比无显著性差异。其原因有待进一步研究。

综合试验结果,水霉菌能够在聚苯乙烯材料的96孔酶标板表面形成明显的生物膜,其生物膜形成与外界的环境因素变化有密切的关系,孢子浓度、pH、温度、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、NaCl的浓度等多种环境因素均能显著影响水霉菌生物膜的形成。

参 考 文 献

- [1] 王丹敏,靳颖,董小青,等. 白色念珠菌生物膜生长动力学分析和形态学观察[J]. 武警医学院学报, 2010, 19(9): 698-700.
- [2] 李秀丽. 新生隐球菌生物膜的构建、影响因素及耐药性的研究[D]. 上海: 第二军医大学博士学位论文, 2007.
- [3] 战文斌. 水产动物病害学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 432.
- [4] Ali SE, Thoen E, Vrålstad T, et al. Development and reproduction of *Saprolegnia* species in biofilms[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 163: 133-141.
- [5] 郜向娜,余加林,芦起,等. 四唑盐减低法结合激光共聚焦显微镜定量分析表皮葡萄球菌生物被膜体外模型[J]. 中国微生态学杂志, 2010, 22(12): 1081-1084,1088.
- [6] 夏文伟. 鲫卵源致病性水霉的分离与鉴定及其生物学特性研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2011.
- [7] Stepanović S, Vuković D, Dakić I, et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2000, 40(2): 175-179.
- [8] Chen Q, Yan Q, Wang K, et al. The portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into *Pseudosciaena crocea* and characteristic of the bacterial adhesion to the mucus[J]. Disease of Aquatic Organism, 2008, 80: 181-188.

- [9] 石淙. 细胞增殖的检测方法[J]. 实验与检验医学, 2012, 30(2): 153-155,168.
- [10] 李丽娟, 陈伟, 许辉, 等. 曲霉生物膜的形成过程与结构特征[J]. 中国真菌学志, 2011, 6(2): 93-97.
- [11] Harding MW, Marques LLR, Howard RJ, et al. Can filamentous fungi form biofilms[J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(11): 475-480.
- [12] Maiorana A, Papi M, Bugli F, et al. A fast and quantitative evaluation of the *Aspergillus fumigatus* biofilm adhesion properties by means of digital pulsed force mode[J]. Applied Surface Science, 2013, 279: 409-415.
- [13] 任晓萍, 杨蓉娅, 樊昕, 等. 真菌生物膜影响因素的研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2009, 4(3): 183-185.
- [14] 钱妩燕, 江涛. 病原菌群体感应系统的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2012, 32(6): 425-430.
- [15] 倪达书. 鱼类水霉病的防治研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 1982: 1-70.
- [16] 张书俊, 杨先乐, 李聘, 等. 施氏鲟水霉病病原的初步研究[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 89-96.
- [17] Castonguay MH, Vander Schaaf S, Koester W, et al. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria[J]. Research in Microbiology, 2006, 157(5): 471-478.
- [18] 袁生, 杜开和, 窦洁, 等. 钙离子在水霉(*Saprolegnia ferax*)菌丝顶端细胞壁中呈极性分布[J]. 实验生物学报, 1996, 2: 159-167.
- [19] Jackson SL, Heath IB. Roles of calcium ions in hyphal tip growth[J]. Microbiological Reviews, 1993, 57(2): 367-382.
- [20] 邢来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2010: 70-74.
- [21] 林雅茵, 余加林, 卢起, 等. 镁离子对黏液型铜绿假单胞菌生物膜形成过程的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 6: 515-518.
- [22] Song B, Leff LG. Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*[J]. Microbiological Research, 2006, 161(4): 355-361.
- [23] Merino S, Gavin R, Altarriba M, et al. The MgtE Mg^{2+} transport protein is involved in *Aeromonas hydrophila* adherence[J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 198(2): 189-195.
- [24] 张世奇. 抗水霉药物的筛选及其制剂的应用效果研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2011.
- [25] 刘杏忠, 沈崇尧, 裘维蕃. 重金属离子对一些水霉的毒性[J]. 植物病理学报, 1989, 3: 47-51.
- [26] Noga EJ. Water mold infections of freshwater fish: recent advances[J]. Annual Review of Fish Diseases, 1993, 3: 291-304.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: (1) 我刊要求作者投稿时在正文前写上主要作者的简介, 并指出自己的工作(已发表的文章)在综述中的体现, 同时请在稿件中用不同颜色标出来。(2) 在专论与综述中引用的文献应该主要是近5年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。