

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00371

致病性嗜水气单胞菌生物膜的形成特性

毛秀秀¹, 覃映雪¹, 邹文政¹, 郭松林¹, 苏永全², 鄢庆枇¹, 纪荣兴¹

1. 集美大学 水产学院, 福建省高校水产科技与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021;
2. 厦门大学 海洋与环境学院, 福建 厦门 361005

摘要: 应用改良的微孔板法研究了致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)B11 的生物膜形成特性。结果显示, 嗜水气单胞菌 B11 能够在聚苯乙烯酶标板表面形成稳定而明显的生物膜, 其生物膜的 OD₅₉₀ 值在 6 h 即达到小高峰, 于 22 h 达到峰值, 其后随着培养时间的延长而降低; 随着初始菌液浓度的增加, 生物膜的 OD₅₉₀ 值逐步降低; 25℃ 的生物膜的 OD₅₉₀ 值显著高于其他温度的生物膜生成量($P < 0.05$); 在起始 pH 值为 3~4 的营养肉汤中, 嗜水气单胞菌几乎不能形成生物膜, OD₅₉₀ 值接近空白对照, 而在 pH 值为 5~10 的营养肉汤中, 嗜水气单胞菌均能形成明显的生物膜, 且差异性不显著($P > 0.05$); 培养液中添加氯化镁达到 1mmol/L 时, 生物膜的 OD₅₉₀ 值会显著性降低($P < 0.05$); 培养液中添加氯化钙达到 1mmol/L 时, 生物膜的 OD₅₉₀ 值显著性提高($P < 0.05$); 嗜水气单胞菌在肌肉组织液包被的 96 孔酶标板上的生物膜形成量有所增加($P < 0.05$), 而在其他黏液和组织提取液包被的酶标板上的生物膜形成量与对照组相比没有显著性差异($P > 0.05$)。研究结果表明, 嗜水气单胞菌 B11 能在聚苯乙烯酶标板表面形成稳定而明显的生物膜; 其生物膜的形成能力受温度、酸碱度、起始菌液浓度、钙、镁离子浓度等因素的影响; 肌肉组织提取液也存在能影响生物膜形成的成分。本研究旨在为探讨嗜水气单胞菌生物膜形成机制和致病机理提供参考。[中国水产科学, 2011, 18(2): 371-378]

关键词: 嗜水气单胞菌; 生物膜; 形成特性

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)02-0371-08

生物膜是指附着在任何物体表面或两相交界面的具有一定结构的微生物群体, 其外包裹了一层由其自分泌的胞外多糖类基质^[1]。与游离菌相比, 形成生物膜微生物具有很多不同的性能, 其标志性的特征就是对于抗菌剂的抗性增强。例如, 形成生物膜的洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)抗性约是其相应的游离菌 15 倍^[2]。另外, 胞外基质成分还能有效抑制免疫细胞的吞噬作用^[3], 并且生物膜还能通过释放游离菌而导致再次感染。由于能污染手术内置器械和导尿管等, 据估计, 大约 65% 医疗感染与生物膜形成有关^[4]。因而, 生物膜已经成为当今医学微生物学领域的一

个研究热点。

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)广泛分布水环境中, 是多种淡水水产动物的致病菌, 还能引起人类疾患^[5]。早在 1985 年, William 等^[6]就对引起人类腹泻的嗜水气单胞菌的临床和微生物学特性进行了研究。目前, 针对嗜水气单胞菌的致病性、致病机制、毒力因子以及检测技术等方面国内外已有很多研究报道^[7-10]。近年来, 关于嗜水气单胞菌生物膜方面的研究已引起国内外有关学者的重视, 在嗜水气单胞菌生物膜口服疫苗方面已有较多报道^[11-12], 而嗜水气单胞菌生物膜形成特性方面还未见有研究报道。本研究以源自鳃

收稿日期: 2010-03-17; 修订日期: 2010-07-02.

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2007AA09Z115); 农业部行业专项(nyhyzx07-043-01); 农业部产业技术体系项目(200907100001); 厦门市科技项目(3502Z20073019, 3502Z20073020).

作者简介: 毛秀秀(1983-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产病害研究. E-mail: maoxiu0202@163.com

通讯作者: 纪荣兴, 男, 教授, 从事水产动物病害防治研究. E-mail: rxji@jmu.edu.cn

鳎的一株致病性嗜水气单胞菌为对象, 研究时间、温度、pH 值、初始菌液浓度、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 以及鳎组织提取液等因子对其成膜的影响, 为探讨嗜水气单胞菌生物膜形成机制和致病机理提供参考。

1 材料与方 法

1.1 菌株及培养条件

嗜水气单胞菌 B11 由病鳎中分离鉴定并保存于 -80°C 超低温冰箱^[13]。

嗜水气单胞菌接种于营养肉汤中, 于 28°C , 180 r/min 振荡培养 7~8 h 至对数生长期, 离心收集细菌细胞, 用 0.85% 无菌生理盐水将菌悬液的 OD_{600} 调至 0.3 左右备用。

1.2 生物膜的形成与测定

体外生物膜形成和测定方法参考 Stepanovic 等的微孔板法^[14]并进行适当改进, 具体步骤如下: 将菌悬液与新鲜营养肉汤按 1:3 体积混合均匀后取 200 μL 加入到 96 孔酶标板小孔中, 25°C 湿盒中静置培养 20 h 后弃去培养液, 用 0.85% 生理盐水 250 μL 清洗 2 次以去除游离细菌, 60°C 烘箱干燥后往各孔加入 200 μL 1% 结晶紫溶液, 25°C 染色 10 min 后弃去染色液, 0.85% 生理盐水 250 μL 清洗 3 次, 加入 33% 乙酸 200 μL , 待完全溶解后用酶标仪(Bio-Rad, 美国)测定 OD_{590} 值。各实验均设 11 个平行, 以不含菌液的培养液为空白对照。

1.3 不同培养时间的生物膜测定

将培养时间设置为 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h、24 h、36 h、48 h、60 h, 按 1.2 方法测定不同培养时间生物膜的 OD_{590} 值。

1.4 不同初始菌液浓度的生物膜测定

将嗜水气单胞菌的起始浓度调至 2.0×10^9 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (OD_{600} 约 1.0), 然后进行 10 倍系列稀释, 分别得到 2.0×10^8 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 2.0×10^7 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 2.0×10^6 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 2.0×10^5 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 2.0×10^4 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 2.0×10^3 $\text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌液, 按 1.2 方法测定各初始菌浓度所形成的生物膜的 OD_{590} 值。

1.5 不同培养温度的生物膜测定

将培养温度设置为 4°C 、 10°C 、 15°C 、 20°C 、 25°C 、 30°C 、 35°C 、 40°C , 按 1.2 方法测定各培养温度所形成的生物膜的 OD_{590} 值。

1.6 不同 pH 值对嗜水气单胞菌生物膜形成的影响

配制 pH 值分别为 3、4、5、6、7、8、9、10 的营养肉汤, 按 1.2 方法测定不同 pH 值条件下形成的生物膜的 OD_{590} 值。

1.7 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 对于嗜水气单胞菌生物膜形成的影响

分别向营养肉汤中添加 CaCl_2 、 MgCl_2 至终浓度为 0.1 mmol/L 和 1 mmol/L, 按 1.2 方法测定添加 CaCl_2 和 MgCl_2 所形成的生物膜的 OD_{590} 值。以不添加 CaCl_2 、 MgCl_2 的营养肉汤为阴性对照。

1.8 不同组织提取液包被对于嗜水气单胞菌生物膜形成的影响

1.8.1 鳎黏液和不同组织提取液的制备 参考 Chen 等^[15]方法分别收集鳎表皮、鳃和肠黏液, 然后分别放入灭菌的 PBS 中混匀; 并取一定量的小肠、肝脏、脾脏、肾脏和肌肉组织, 分别匀浆后, 于 4°C 、20 000 g 离心 2 次, 每次 30 min, 取上清; 采用考马斯亮蓝法^[16]将蛋白质含量调至 1 mg/mL, 然后依次用 0.45 μm 、0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 置于 4°C 冰箱待用。

1.8.2 鳎黏液和不同组织提取液包被对于嗜水气单胞菌生物膜形成的影响 在 96 孔酶标板各孔分别加入 200 μL 制备的鳎体表黏液、鳃黏液、肠黏液和肠、肝脏、脾、肾脏、肌肉组织提取液, 4°C 包被 18 h 后弃去残留组织液, 用 250 μL 生理盐水清洗 2 次; 按 1.2 方法测定不同组织提取液包被后形成的生物膜的 OD_{590} 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 \pm 标准差表示 $\bar{x} \pm \text{SD}$, 用 EXCELL, SPSS 进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 培养时间对嗜水气单胞菌成膜的影响

嗜水气单胞菌在聚苯乙烯酶标板表面形成的

生物膜的 OD₅₉₀ 值先随着培养时间的延长而增大, 并于 6 h 达到小高峰, 随后逐渐下降, 于 14 h 降至最低, 然后再逐渐上升, 于 22 h 达到峰值, 其后生物膜的 OD₅₉₀ 值随着培养时间的延长而缓慢降低(图 1)。

2.2 初始菌液浓度对嗜水气单胞菌成膜的影响

随着初始菌液浓度的增加, 生物膜的形成量呈逐步降低的趋势。初始菌液浓度为 2×10³ CFU·mL⁻¹ 和 2×10⁹ CFU·mL⁻¹ 时候生物膜形成量与其他各组相比均具有显著性差异(P<0.05), 而其他各相邻两组之间没有显著性差异(图 2)。

2.3 培养温度对嗜水气单胞菌成膜的影响

如图 3 所示, 在 4~25℃ 范围为, 随着温度的

升高, 生物膜的形成量逐步增高, 4℃、10℃、15℃、20℃、25℃ 的生物膜形成量之间均具有显著性差异(P<0.05); 当温度达到 30℃ 以后, 生物膜的形成量迅速下降, 30℃ 和 35℃ 的生物膜形成量没有显著性差异; 而 35℃ 和 40℃ 的生物膜形成量之间具显著性差异。

2.4 不同初始 pH 值对嗜水气单胞菌生物膜形成的影响

如图 4 所示, 在起始 pH 值为 3 和 4 的营养肉汤中, 嗜水气单胞菌不能形成生物膜, 其 OD₅₉₀ 值接近于零。在起始 pH 值为 5~10 的营养肉汤中, 嗜水气单胞菌均能形成生物膜, 在 pH5、pH8 和 pH10 之间有显著性差异(P<0.05), 而 pH 值分别

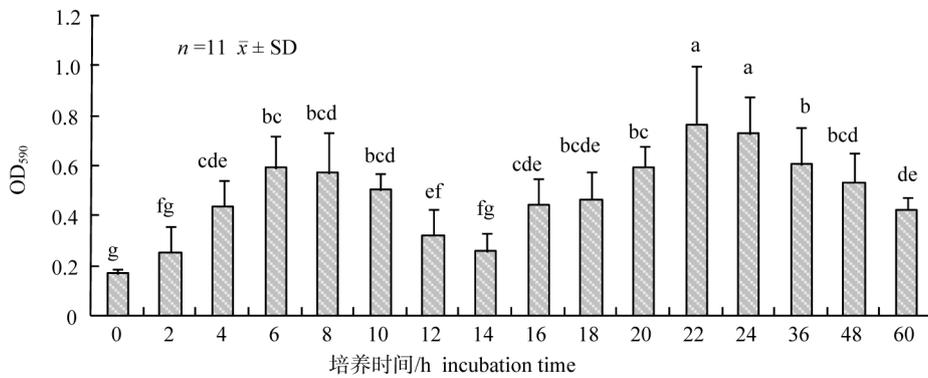


图 1 不同培养时间嗜水气单胞菌形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值
柱上不同字母表示组间数据差异显著(P<0.05)。

Fig. 1 OD₅₉₀ values of *A. hydrophila* B11 biofilms of different incubation times
Data with different letters are significantly different (P < 0.05) among different groups.

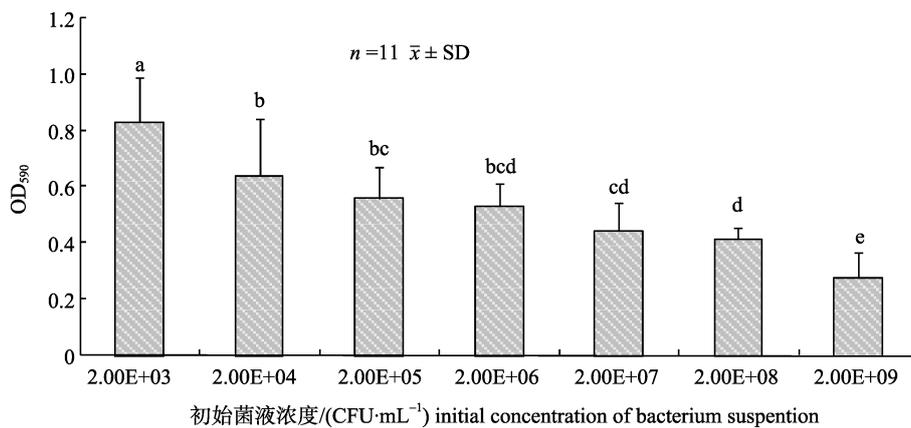


图 2 不同初始菌液浓度嗜水气单胞菌形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值
柱上不同字母表示组间数据差异显著(P<0.05)。

Fig. 2 OD₅₉₀ values of *A. hydrophila* B11 biofilms of different initial bacterial densities
Data with different letters are significantly different (P < 0.05) among different groups.

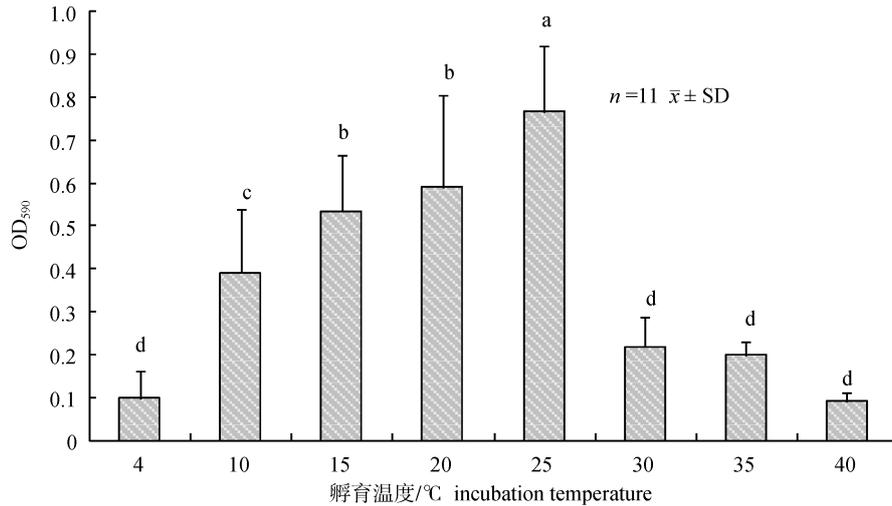


图 3 不同温度嗜水气单胞菌形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值

柱上不同字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 3 OD₅₉₀ values of *A. hydrophila* B11 biofilms developed at different temperatures. Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

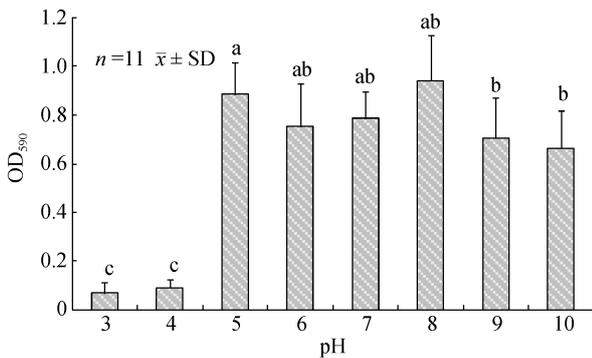


图 4 嗜水气单胞菌在不同 pH 值条件下形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值

每个不同柱形图上面的不同的字母表示组之间是显著性差异 ($P < 0.05$)。

Fig. 4 OD₅₉₀ values of *A. hydrophila* B11 biofilms developed at different pH values. Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

为 5、6、7、8、9 时生物膜生成量之间无显著性差异 ($P > 0.05$), pH 值为 9 和 10 时生物膜生成量之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.5 不同 Ca²⁺、Mg²⁺ 浓度对于嗜水气单胞菌生物膜形成的影响

如图 5 所示, 当培养基添加氯化镁浓度达到 0.1 mmol/L 时, 嗜水气单胞菌形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值与对照组之间没有显著性差异, 而氯化

镁浓度达到 1 mmol/L, 嗜水气单胞菌形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值显著 ($P < 0.05$) 低于对照组和 0.1 mmol/L 氯化镁添加组; 添加 0.1 mmol/L 氯化钙时, 与对照组之间没有显著性差异 ($P > 0.05$); 氯化钙浓度达到 1 mmol/L 时, 嗜水气单胞菌形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值显著 ($P < 0.05$) 高于对照组和 0.1 mmol/L 氯化钙添加组 (图 6)。

2.6 鳗鲡不同组织提取液对嗜水气单胞菌成膜的影响

如图 7 所示, 与对照组相比, 嗜水气单胞菌

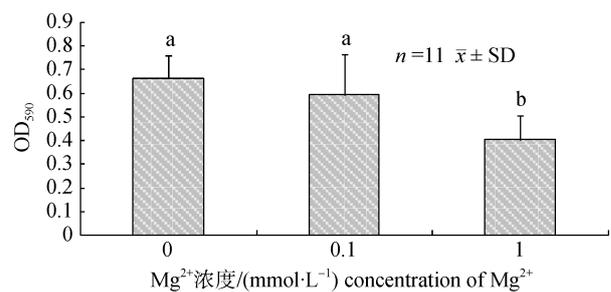


图 5 嗜水气单胞菌在添加不同浓度 Mg²⁺ 条件下形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值

柱上不同字母表示组间数据差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 OD₅₉₀ values of *A. hydrophila* B11 biofilms developed under different concentrations of Mg²⁺. Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

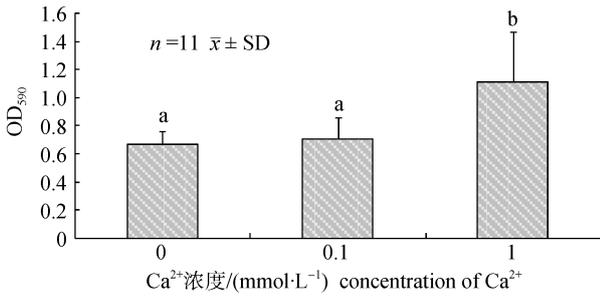


图 6 嗜水气单胞菌在添加不同浓度 Ca²⁺条件下形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值

注: 柱上不同字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

Fig.6 OD₅₉₀ values of *A. hydrophila* B11 biofilms developed under different concentrations of Ca²⁺

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

在肌肉组织液包被的 96 孔酶标板上的生物膜形成量有所增加($P < 0.05$), 而其他不同部位的黏液和不同组织提取液包被的酶标板上的生物膜形成量与对照组不存在显著性差异($P > 0.05$)。

3 讨论

Chandra 等^[17]研究发现, 白色念珠菌(*Candida albicans*)的生物膜形成过程可分为: 早期阶段(约 0~11h)→中间形成阶段(12~30 h)→成熟阶段(38~

72 h)。在起始 1~2 h, 主要是黏附阶段, 3~4 h 出现明显的微生物群落; 直到 11 h, 微生物群体厚度伴随微生物的生长、群集而出现逐步增长的趋势; 12~14 h, 开始出现非细胞物质, 也即胞外多聚物, 像一层膜裹着微生物群落; 直到进入成熟期, 随时间推移胞外多聚物逐步增多直到将整个微生物群体覆盖。本研究结果显示, 嗜水气单胞菌的生物膜形成基本上也可以分为 4 个阶段, 0~6 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, 导致酶标板表面的微生物生物量逐步增加; 6~14 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, 原因有待进一步研究; 14~22 h 为生物膜成熟阶段, 生物膜形成量逐步增长; 22 h 之后为消退阶段, 表现为生物膜的量逐渐减少。成熟的生物膜内细菌会出现异化、死亡或从生物膜内播散以及生物膜基质成分被分解, 从而导致生物膜结构崩解和生物膜生命周期的终结^[18]。Sternberg 等^[19]认为, 启动生物膜崩解的原因之一是营养饥饿。本研究中的生物膜的消退也是由于营养物质被耗竭。

齐显龙等^[20]研究发现, 痤疮丙酸杆菌最佳成膜浓度为 10×10^8 CFU/mL。本研究结果发现, 较低

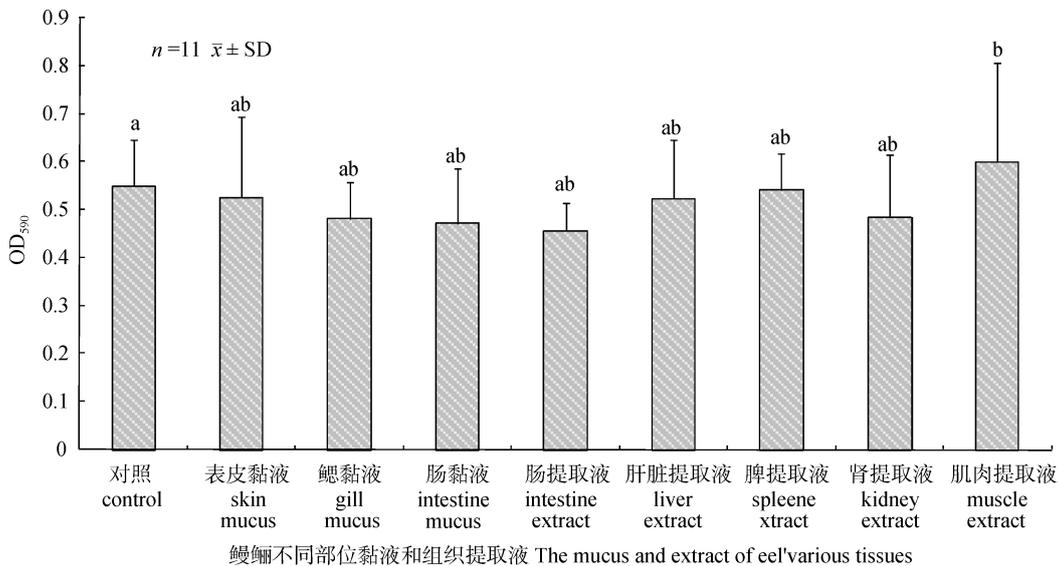


图 7 嗜水气单胞菌在包被不同组织提取液的酶标板上形成的生物膜的 OD₅₉₀ 值

柱上不同字母表示组间数据差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 7 OD₅₉₀ values of *A. hydrophila* B11 biofilm developed on the surfaces of the microtiter plate coated with different tissue extracts of eel. Data with different letters are significantly different ($P < 0.05$) among different groups.

的菌浓度有利于嗜水气单胞菌生物膜的形成。结果表明嗜水气单胞菌生物膜中的细菌可能主要由早期黏附细胞繁殖而来,并非主要来自于培养液中细菌的集聚。Costerton 等^[21]研究发现,生物膜含有 10%~25%的细菌和 75%~90%的胞外多糖基质。较低的起始菌液浓度不仅有利于嗜水气单胞菌的生长繁殖,也可能会有利于嗜水气单胞菌胞外多聚物的合成,进而有利于生物膜的形成。

嗜水气单胞菌的最适生长温度为 25~35℃^[8],与其成膜最适温度不一致。这说明生物膜的形成与其生长繁殖在生理活动上有所不同。Shemesh 等^[22]采用体外比较转录分析的方法来鉴定变异链球菌(*Streptococcus mutans*)在生物膜状态下和浮游状态时的基因表达,结果发现约 12%的基因有显著性差异表达;在相对于浮游状态而言的生物膜状态下的变异链球菌,有 139 种基因被激活,104 种基因被抑制,有 20 种被选择基因的差异表达。

嗜水气单胞菌生长合适的 pH 值为 5.5~9.0^[8],本实验结果显示,初始 pH 值为 3~4,生物膜形成能力很弱,这主要在于 pH 值为 3~4 对嗜水气单胞菌是极端酸性环境,细菌不生长;而初始 pH 值在 5~10 之间的生物膜形成出现了差异,差异性不显著,这主要是由于嗜水气单胞菌具有比较广的 pH 适应范围。

金属阳离子作为交联桥,能影响到细菌外膜的整体性和稳定性,以及细菌脂多糖稳定^[23]。Koerstgens 等^[24]认为当钙离子达到一定浓度,生物膜显著增长,原因主要在于其与藻酸盐的交联作用降低了生物膜的机械流动性,从而更有利于生物膜的形成和稳固。这与本实验的研究结果相吻合。

Song 等^[25]发现,镁离子能促进荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescense*)的早期黏附和后续生物膜及其结构的形成,生物膜的表面群落和厚度随着镁离子浓度的升高而增长。然而,不同的研究显示,由于镁离子浓度的差异以及细菌种的差异性,镁离子对于不同的细菌黏附能力具有不同的影响效应^[26-27],进而对于生物膜的形成也会产生不同的影响。本研究发现,镁离子能抑制嗜

水气单胞菌生物膜的形成。

Villasefior 等^[28]发现,细菌在不同碳源基质上成膜效果不同。黏附于载体表面是微生物形成生物膜的早期必经阶段^[29]。Chen 等^[15]研究发现,病原性溶藻弧菌能够黏附于大黄鱼表皮黏液、鳃黏液和肠黏液,其中对肠黏液的黏附作用最强。本研究中,鳃黏液、鳃黏液、肠黏液、以及小肠、肝脏、脾、肾等器官的组织提取液包被后生物膜生成量与对照组相比无显著性差异,仅有鳃肌肉提取液能促进生物膜的形成,其原因有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Costerton J W, Lewandowski Z, Caldwell D E, et al. Microbial biofilms [J]. Annu Rev Microbiol, 1995,49: 711-745.
- [2] Desai M, Buhler T, Weller P H, et al. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth [J]. Antimicrob Chemother. 1998, 42: 153-160.
- [3] Meluleni G J, Grout M, Evans D J, et al. Mucoicid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoicid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients[J]. Immunology, 1995, 155: 2029-2038.
- [4] Chicurel M. Bacterial biofilms and infections - slimebusters [J]. Nature, 2001, 408: 284-86.
- [5] Gracey M V, Burke V, Robinson J, et al. *Aeromonas*-associated gastroenteritis[J]. Lancet, 1982, 11: 1304-1306.
- [6] Agger W A, McCormick J D, Gurwith M J. Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea[J]. J Clin Microbiol, 1985, 21(6): 909-913.
- [7] Santos Y, Toranzo A E, Barja J L, et al. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish[J]. Infect Immun, 1988, 56(12): 3285-3293.
- [8] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报, 1992, 16(3): 282-286.
- [9] Pollard D R, Johnson W M, Lior H, et al. Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction[J]. Clin Microbiol, 1990, 28(11): 2477-2481.
- [10] Delamare A P L, Echeverrigaray S, Duarte K R, et al. Production of a monoclonal antibody against *Aeromonas hydrophila* and its application to bacterial identification[J]. J

- Appl Microbiol, 2002, 92(5): 936–940
- [11] Asha A, Nayaka D K, Shankar K M, et al . Antigen expression in biofilm cells of *Aeromonas hydrophila* employed in oral vaccination of fish[J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 16: 429–436.
- [12] 张吉红, 储卫华, 陆承平 . 口服嗜水气单胞菌生物被膜疫苗的动物免疫试验[J]. 中国水产科学, 2004, 11: 404–407.
- [13] 郭松林, 关瑞章, 柳佩娟 . 双重 PCR 法快速检测欧鳊嗜水气单胞菌[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2007, 12(4): 294–300.
- [14] Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, et al . Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation[J]. J Microbiol Meth, 2000, 40: 175–179.
- [15] Chen Q, Yan Q, Wang K, et al . The portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into *Pseudosciaene crocea* and characteristic of the bacterial adhesion to the mucus[J]. Dis Aqu Organ, 2008, 80: 181–188.
- [16] Bradford M M . A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analyt Biochem, 1976, 72: 248–254.
- [17] Chandra J, Kuhn D M . Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance[J]. J Bacteriol, 2001, 183: : 5385–5394.
- [18] Webb J S, Givskov M, Kjelleberg M. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity[J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6: 578–585.
- [19] 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.
- [20] 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 .
- [21] Costerton W, Veeh R, Shirtliff M, et al . The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections [J] . J Clin Invest, 2003, 112(60): 1466–1477 .
- [22] Shemesh M, Tam A, Steinberg D . Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions[J]. Microbiology, 2007, 153: 1307–1317.
- [23] Geesey G G, Wigglesworth-Cooksey B, Cooksey K E . Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: a review[J]. Biofouling, 2000, 15: 195–205.
- [24] Koerstgens V, Flemming H C, Wingender J, et al . Influence of calcium ions on the mechanical properties of a model biofilm of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Water Sci Technol, 2001, 43: 49–57.
- [25] Song B, Leff L G . Influence of magnesium ions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*[J]. Microbiol Res, 2006, 161: 355–361.
- [26] Tamura G S, Kuypers J M, Smith S, et al . Adherence of group B Streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components[J]. Infect Immun, 1994, 62: 2450–2458.
- [27] Dunne W M Jr, Burd E M . The effects of magnesium, calcium, EDTA, and pH on the in vitro adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to plastic[J]. Microbiol Immunol, 1992, 36: 1019–1027.
- [28] Villasefior J C, Van L M C M, Picioreanu C, et al . Influence of different substrates on the formation of biofilms in a biofilm airlift suspension reactor[J]. Water Science and Technology, 2000, 41(4): 323–330.
- [29] O’Tool G, Kaplan H B, Kolter R. Biofilm formation as microbial development [J]. Annu Rev Microbiol, 2000, 54: 49–79.

Characteristics of biofilm formation of pathogenic *Aeromonas hydrophila*

MAO Xiuxiu¹, QIN Yingxue¹, ZOU Wenzheng¹, GUO Songlin¹, SU Yongquan², YAN Qingpi¹, JI Rongxing¹

1. Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: The characteristics of biofilm formation of pathogenic *Aeromonas hydrophila* B11 was investigated by the method of modified microtiter-plate test. The results showed that *A. hydrophila* B11 developed stable and evident biofilm on the surface of the polystyrene microtiter plate, and the OD₅₉₀ value of biofilm reached the secondary peak in 6 h and the highest peak in 22 h and then reduced with incubation time. The OD₅₉₀ value of the biofilm decreased with densities of initial bacterial suspension. The OD₅₉₀ value of biofilm recorded at 25 °C was significantly higher than those recorded at other temperatures ($P < 0.05$). *A. hydrophila* B11 developed evident biofilm under initial pH 5–10, while no evident biofilm was found under initial pH 3–4. When 1 mmol/L magnesium ion was added, in the biofilm formation of *A. hydrophila* was significantly inhibited ($P < 0.05$), while calcium ion significantly promoted the formation of biofilm ($P < 0.05$). Compared with the control group, only biofilm developed on the surface of the microtiter plate coated by the extract of eel's muscle exhibited remarkably higher value of OD₅₉₀ ($P < 0.05$), while the biofilms on the microtiter plate coated by other extracts of tissues showed no remarkable difference ($P > 0.05$). The results indicate that: *A. hydrophila* B11 strain can form biofilm on the surface of polystyrene microtiter plate; the bacterial biofilm formation can be affected by different environmental factors such as temperature, bacterial concentration, pH, Mg²⁺ and Ca²⁺ concentrations and so on; muscle extract of eel can promote the biofilm formation. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 371–378]

Key words: *Aeromonas hydrophila*; biofilm; characteristics

Corresponding author: JI Rongxing. E-mail: rxji@jmu.edu.cn