

黑木耳提取物对大肠杆菌生物膜形成的抑制作用

李 斌, 董明盛*

(南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 采用卡尔加里生物膜装置和菌落计数法研究黑木耳粗提物对大肠杆菌 *Escherichia coli* 8099 生物膜形成的影响, 同时利用光学显微镜和激光共聚焦显微镜观察黑木耳粗提物对大肠杆菌生物膜形态结构的影响。结果表明: 黑木耳粗提物能有效抑制大肠杆菌生物膜的形成, 其质量浓度为 0.3 g/mL 时抑制率可以达到 73.00%。

关键词: 黑木耳; 大肠杆菌; 生物膜; 抑制

Inhibition Effect of *Auricularia auricula* Extract on Biofilm Formation of *Escherichia coli*

LI Bin, DONG Ming-sheng*

(College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The inhibition effect of *Auricularia auricula* extract on the biofilm formation of *Escherichia coli* 8099 was investigated using Calgary biofilm device and colony count method. Meanwhile, the morphology and structure of *E. coli* biofilm were also examined using optical microscope and confocal laser scanning microscope after treatment of *Auricularia auricula* extract. The results indicated 0.3 g/mL of *Auricularia auricula* extract obviously inhibited the biofilm formation of *E. coli* and the inhibition rate reached up to 73.0%.

Key words: *Auricularia auricula*; *Escherichia coli*; biofilm; inhibition

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)13-0139-04

细菌生物膜是指由附着于惰性或者活性固体表面的细菌细胞和包裹着细菌的水合性基质所组成的结构性细菌群落^[1]。现已证明, 很多久治不愈的慢性细菌性感染与生物膜有关。细菌可在人体组织如牙齿、皮肤、肺、尿道及其他器官的表面形成生物膜, 引起诸如肺囊性纤维化、弥漫性泛细支气管炎、牙周炎、胆道感染、心瓣膜性心内膜炎等^[2-3]。细菌能黏附在大多数医疗器械的材料表面并形成生物膜, 如静脉导管、导尿管、气管插管、人工心脏瓣膜、隐形眼镜等^[4-5]。此外, 生物膜细菌还可污染与人类生活相关的供水系统、空调系统和食品加工设备等, 由此造成传染病的流行^[6-7]。据估计, 大约 65% 人类细菌性感染是由生物膜细菌引起的。因此如何抑制生物膜形成引起了学者们的广泛关注。

黑木耳(*Auricularia auricula*)隶属真菌门、担子菌纲、木耳目、木耳科、木耳属, 是著名药食两用真菌。子实体除含有丰富的蛋白质、纤维素等营养物质外, 还含有丰富的 B 族维生素以及钙、磷、铜等有益元素。黑木耳多糖还具有抗肿瘤、抗血栓、抗衰老、

降血糖、降血脂、调节免疫等功能^[8]。从木耳子实体中分离的黑刺菌素(adustin)有抗真菌作用。深入研究黑木耳的主要活性成分, 探索其对人类的有益作用, 具有重要的现实意义。我国是世界上主要的黑木耳生产国, 其人工栽培起源于我国, 年产量占世界总产量的 90% 以上。黑木耳在我国多数地区都有生产, 据记载已有 1000 多年历史。本实验主要研究黑木耳提取物对大肠杆菌生物膜形成的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黑木耳子实体(产地黑龙江绥阳) 市购。8- 苯胺-1- 萘磺酸 Sigma 公司。

Escherichia coli 8099 由本实验室保存, 在 LB 培养基中 37℃ 培养。

LB 培养基: NaCl 10g、胰蛋白胨 10g、酵母粉 5g、水 1000mL, pH7.0。

1.2 仪器与设备

收稿日期: 2010-04-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30700627); 江苏省农业科技自主创新项目(CX(08)113)

作者简介: 李斌(1984—), 女, 博士研究生, 研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail: binbin27_lee@163.com

* 通信作者: 董明盛(1961—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品微生物与生物技术。E-mail: dongms@njau.edu.cn

旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂; 卡尔加里生物膜装置(Calgary biofilm device, CBD) 加拿大Innovotech公司; BIO-TEX ELX808 全自动定量绘图酶标仪 美国BIO-TEX公司; Nikon Eclipse 80i 显微镜 日本尼康公司; Leica TCS SP2 激光共聚焦显微镜 德国Leica公司。

1.3 方法

1.3.1 样品处理

黑木耳子实体经35℃恒温烘干24h, 粉碎, 过40目筛, 取10g粉末, 加入乙酸乙酯40mL, 静置提取24h后, 过滤除去残渣, 滤液经旋转蒸发仪蒸干(真空度0.1Pa, 温度30℃), 再用2mL的甲醇重悬, 重悬液经0.22μm的有机膜过滤除菌, 黑木耳粗提物质量浓度为5g/mL, -20℃保藏, 备用^[9]。

1.3.2 粗提物对 *Escherichia.coli* 8099 生物膜形成的影响

1.3.2.1 CBD板法

该法参考的是1999年O'Toole等^[10]提出的方法。*Escherichia.coli* 8099 活化两次后, 按1%的比例接种新鲜的LB培养基, CBD板每个孔内加入2、4、6μL的黑木耳粗提物, 对照为甲醇, 每个样品及对照做3个平行样, 37℃培养24h后, 用蒸馏水清洗带有小柱的上盖3~5次; 取另一个干净的CBD板, 加入125μL 0.3g/100mL结晶紫, 将带有小柱的上盖盖上染色15min, 用蒸馏水清洗3~5次, 去除多余的染料, 再在另一个干净的CBD板内加入200μL 95%乙醇溶解出结合于生物膜上的结晶紫, 酶标仪测定OD_{595nm}。

1.3.2.2 菌落计数法

通过计算生物膜中的活菌数对生物膜进行量化。为了将生物膜与其黏附的固体表面分离, 通常使用一些机械方法, 比如超声或涡旋, 得到的菌液常用平板菌落法, 通过计算菌落形成单位(colony forming units, CFU)对生物膜内的活菌计数。该法参考Hentzer等^[11]提出的方法。*Escherichia.coli* 8099 过夜培养后按2%的比例接种新鲜的LB培养基中, 该稀释液按一定量加入到已放有灭菌过的聚氯乙烯(PVC)小片的无菌试管中, 加入黑木耳粗提物20、40、60μL, 对照为甲醇, 每个样品及对照做3个平行对照, 37℃培养24h后, 将PVC小片取出, 用无菌的磷酸盐缓冲液冲洗3~5次, 以洗去游离细胞。然后将PVC小片放入磷酸盐缓冲液中超声20min, 以使生物膜中的细胞脱落。最后将细胞悬浮液稀释到合适浓度, 涂布于固体的LB培养基上, 37℃培养48h后计数。

1.3.2.3 光学显微镜实验

E.coli 8099 活化两次后, 按1%的比例接种至新鲜的LB培养基中。在24孔板里放置10mm×10mm的玻璃片作为大肠杆菌生物膜黏附的载体, 加入980μL上述菌

液, 再分别加入10、20μL甲醇和10、20μL黑木耳粗提物, 空白对照为1mL上述菌液, 37℃培养24h, 用蒸馏水清洗3~5次, 番红简单染色后于光学显微镜下观察成膜情况。

1.3.2.4 激光共聚焦显微镜实验

E.coli 8099 过夜培养后按5%的比例接种新鲜的LB培养基中, 该稀释液按一定量加入到已放有10mm×10mm玻片的24孔板里, 加入黑木耳粗提物。37℃培养, 每隔24h更新一次LB培养基, 共培养3d。蒸馏水清洗3~5次, 用0.1mol/L pH6.8磷酸缓冲液配成的 1.25×10^{-3} mol/L的荧光染料8-苄胺-1-萘磺酸溶液染色避光2h, 激光共聚焦显微镜下观察成膜情况, 每块玻片上随机取3处测定生物膜厚度。

2 结果与分析

2.1 CBD板法

黑木耳粗提物对生物膜形成的影响结果见表1, 未添加甲醇和黑木耳提取物的*E.coli* 8099 培养基的OD_{595nm}是1.049±0.043。

表1 黑木耳粗提物对 *E.coli* 8099 生物膜形成的影响(CBD板法)
Table 1 Effect of *Auricularia auricula* extract on *E.coli* 8099 biofilm formation (CBD plate assay)

| <i>E.coli</i> 稀释液 体积/μL | 黑木耳粗提 物体积/μL | 甲醇体 积/μL | 黑木耳粗提物质 量浓度/(g/mL) | OD _{595nm} | 抑制率/% |
|----------------------------|-----------------|-------------|-----------------------|---------------------|-------|
| 98 | 2 | — | 0.1 | 0.430±0.023 | 59.01 |
| | — | 2 | — | 1.049±0.006 | — |
| 96 | 4 | — | 0.2 | 0.347±0.019 | 66.86 |
| | — | 4 | — | 1.047±0.008 | — |
| 94 | 6 | — | 0.3 | 0.283±0.002 | 73.00 |
| | — | 6 | — | 1.048±0.008 | — |

注: —, 未添加; 下同。

由表1可知, 甲醇不抑制生物膜的形成。随着黑木耳粗提物质量浓度的升高, 对生物膜形成的抑制率也逐渐升高, 当菌液中黑木耳粗提物的浓度达到0.3g/mL时, 其对生物膜形成的抑制率达到73.00%。这种方法是一种传统方法^[12-13], 为了验证实验结果, 本实验同时采用了菌落计数法。

2.2 菌落计数法

该法通过直接计算生物膜内的活菌数对生物膜进行量化。未添加甲醇和黑木耳提取物的*E.coli* 8099 培养基的lg(CFU/chip)是6.358±0.003。

由表2可知, 甲醇不抑制生物膜的形成。随着黑木耳粗提物质量浓度的提高, 其对*E.coli* 8099 生物膜形成的抑制能力也在逐渐提高。0.3g/mL的粗提物对生物膜的抑制率是71.63%。由于PVC小片和CBD的材料形状不同, 加上操作也不同, 所以就同一菌株生物膜实

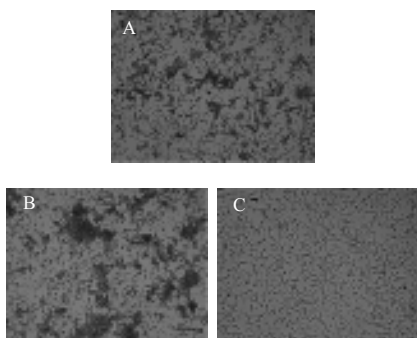
验得出结果有所差异应属正常。

表2 黑木耳粗提物对 *E.coli* 8099 生物膜形成的影响 (菌落计数法)

| Table 2 Effect of <i>Auricularia auricula</i> extract on <i>E.coli</i> 8099 biofilm formation (colony count method) | | | | | |
|---|-------------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-------|
| <i>E.coli</i> 稀释液体积/ μL | 黑木耳粗提物体积/ μL | 甲醇体积/ μL | 黑木耳粗提物质质量浓度/(g/mL) | lg(CFU/chip) | 抑制率/% |
| 980 | 20 | — | 0.1 | 4.843 ± 0.01 | 24.06 |
| | — | 20 | — | 6.377 ± 0.004 | — |
| 960 | 40 | — | 0.2 | 3.620 ± 0.016 | 43.10 |
| | — | 40 | — | 6.362 ± 0.005 | — |
| 940 | 60 | — | 0.3 | 1.793 ± 0.002 | 71.63 |
| | — | 60 | — | 6.321 ± 0.002 | — |

2.3 光学显微镜实验

将培养 24h 的大肠杆菌生物膜置于 400 倍光学显微镜下观察, 结果见图 1。



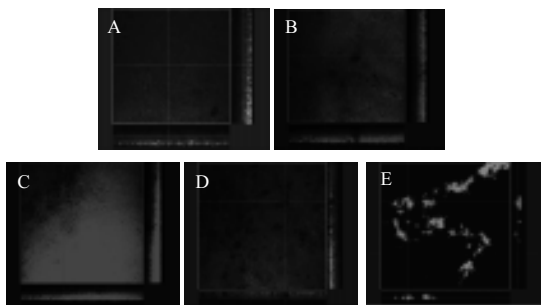
A. 未添加任何试剂; B. 添加 10 μL 甲醇; C. 添加 10 μL 黑木耳提取物。

图1 大肠杆菌生物膜镜检图($\times 400$)

Fig.1 Microscopic image of *E. coli* biofilm ($\times 400$)

由图 1 可知, 添加了 10 μL 甲醇的大肠杆菌在玻片上形成比较多的菌团单位, 未添加任何试剂的菌团单位相对较少, 而黑木耳粗提物质质量浓度为 0.1g/mL 的大肠杆菌在玻片上几乎不形成任何菌团单位。

2.4 激光共聚焦显微镜实验



A. 未添加任何试剂; B. 添加 10 μL 甲醇; C. 添加 20 μL 甲醇; D. 添加 10 μL 黑木耳提取物; E. 添加 20 μL 黑木耳提取物。

图2 大肠杆菌生物膜三维结构($\times 630$)

Fig.2 3D structure of *E. coli* biofilm ($\times 630$)

将连续培养 3d 的大肠杆菌生物膜置于 630 倍激光共聚焦显微镜下观察, 结果见图 2。添加了 10、20 μL 甲醇的大肠杆菌在玻片上形成较厚、有孔状通道的成熟生物膜, 添加了 20 μL 甲醇的尤其密集, 未添加任何试剂的生物膜相对减少, 而黑木耳粗提物质质量浓度为 0.1、0.2g/mL 的大肠杆菌在玻片上形成比较稀疏的菌团单位, 黑木耳粗提物质质量浓度为 0.2g/mL 的是碎片状结构, 这一结果同光学显微镜观察的结果相同。形成的生物膜的厚度如表 3 所示。

表3 激光共聚焦显微镜实验结果

Table 3 Thickness of *E. coli* biofilm examined with confocal laser scanning microscope

| <i>E.coli</i> 稀释液体积/ μL | 黑木耳粗提物体积/ μL | 甲醇体积/ μL | 黑木耳粗提物质质量浓度/(g/mL) | 生物膜厚度/ μm |
|------------------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| 1000 | — | — | 0 | 22.440 ± 1.362 |
| 990 | — | 10 | — | 26.163 ± 1.574 |
| 980 | — | 20 | — | 26.780 ± 1.577 |
| 990 | 10 | — | 0.1 | 18.100 ± 1.223 |
| 980 | 20 | — | 0.2 | 11.130 ± 1.073 |

由表 3 可知, 黑木耳粗提物质质量浓度为 0.1、0.2g/mL 的大肠杆菌生物膜厚度相对于未添加任何试剂的大肠杆菌生物膜厚度分别减少了 19.34%、50.40%, 说明了黑木耳提取物可以明显抑制大肠杆菌生物膜的形成, 其抑制程度随黑木耳粗提物质质量浓度的增大而提高。

3 讨论

研究了黑木耳提取物对 *Escherichia coli* 8099 生物膜的形成的影响, 发现其明显减弱了生物膜的形成, 并且影响程度受黑木耳提取物质量浓度的影响, 随着质量浓度的增大, 受抑制程度随之提高。在我国, 黑木耳作为一种食品和药品已经有几个世纪的历史, 黑木耳粗提物或者从中分离到的一些特殊化合物可能被人用于研制控制或抑制有害生物膜形成的新型抑制剂。此外, 为了能将黑木耳粗提物应用于食品领域, 其成分以及成分结构需要进一步的研究, 这也是本实验室今后研究工作的重点。

参考文献:

- [1] COSTERTON J W, LEWANDOWSKI Z, deBEER D, et al. Biofilms, the customized microniche[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(8): 2137-2142.
- [2] COSTERTON J W, STEWART P S, GREENBERG E P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections[J]. Science, 1999, 284 (5418): 1318-1322.
- [3] PARSEK M R, SINGH P K. Bacterial biofilms: an emerging link to

- disease pathogenesis[J]. Annu Rev Microbiol, 2003, 57: 677-701.
- [4] COSTERTON J W, MONTANARO L, ARCIOLA C R. Biofilm in implant infections: its production and regulation[J]. Int J Artif Organs, 2005, 28(11): 1062-1068.
- [5] SHIMIZU K, KOBAYAKAWA S, TSUJI A, et al. Biofilm formation on hydrophilic intraocular lens material[J]. Curr Eye Res, 2006, 31(12): 989-997.
- [6] SIMOES M, PEREIRA M O, VIEIRA M J. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals[J]. Water Res, 2005, 39(20): 5142-5152.
- [7] van HOUTT R, AERTSEN A, JANSEN A, et al. Biofilm formation and cell-to-cell signalling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment[J]. J Appl Microbiol, 2004, 96(1): 177-184.
- [8] 杨庆尧. 食用菌生物学基础[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 1-7.
- [9] ADONIZIO A, KONG K F, MATHEE K. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extract[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52(1): 198-203.
- [10] O' TOOLE G A, PRATT L A, WATNICK P I, et al. Genetic approaches to study of biofilms[J]. Methods Enzymol, 1999, 310: 91-109.
- [11] HENTZER M, TEITZEL G M, BALZER G J, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(18): 5395-5401.
- [12] XU Lin, LI Hualin, VUONG C, et al. Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis* [J]. Infection and Immunity, 2006, 74(1): 488-496.
- [13] GIRENNAVAR B, CEPEDA M L, SONI K A, et al. Grapefruit juice and its furocoumarins inhibits autoinducer signaling and biofilm formation in bacteria[J]. Int J Food Microbiol, 2008, 125(2): 204-208.