

# Observation of Biofilm of RA by Immobilizing on Glutaraldehyde Treated Silicon Surface

Shu Jiang<sup>1,2</sup>, Dingrong Liao<sup>1</sup>, Baixue Wang<sup>1</sup>, Chenghong Huang<sup>2\*</sup>, Hongjie Chen<sup>1</sup>, Yanjing Guo<sup>1</sup>, Mengting Hu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chongqing Vocational College of Light Industry, Chongqing

<sup>2</sup>Chongqing University of Science and Technology, Chongqing

Email: \*chhuang2007@sinano.ac.cn

Received: Feb. 4<sup>th</sup>, 2019; accepted: Feb. 19<sup>th</sup>, 2019; published: Feb. 27<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

Biofilm from *Riemerella anatipestifer* (RA) is a kind of virulence factor that has already been confirmed. However, its formation mechanism and virulence contribution are still not well understood. The purpose of this study is to develop a simple and facile method for BF observation through surface aldehyde immobilization on the silicon substrate and direct investigation of BF microstructure by SEM technique with the help of heating and gold spraying. Results show that RA can be effectively fixed on aldehyde-treated silicon surface. BF microstructure can be clearly observed after 60°C drying together with 5 seconds gold treatment. Compared with conventional ink staining and phosphotungstic acid staining, this method has the advantages of short time and easy-to-operation. It will provide a novel method for RA's biofilm research.

## Keywords

RA, Biofilm, SEM

# 醛基化玻片固定里默氏杆菌观察生物膜

蒋 姝<sup>1,2</sup>, 廖定容<sup>1</sup>, 王白雪<sup>1</sup>, 黄承洪<sup>2\*</sup>, 陈虹洁<sup>1</sup>, 郭艳婧<sup>1</sup>, 胡梦婷<sup>1</sup>

<sup>1</sup>重庆轻工职业学院, 重庆

<sup>2</sup>重庆科技学院, 重庆

Email: \*chhuang2007@sinano.ac.cn

收稿日期: 2019年2月4日; 录用日期: 2019年2月19日; 发布日期: 2019年2月27日

\*通讯作者。

文章引用: 蒋姝, 廖定容, 王白雪, 黄承洪, 陈虹洁, 郭艳婧, 胡梦婷. 醛基化玻片固定里默氏杆菌观察生物膜[J]. 微生物前沿, 2019, 8(1): 9-14. DOI: 10.12677/amb.2019.81002

## 摘要

生物膜是里默氏杆菌(RA)的毒力因子早已被证实,但目前对于RA生物膜的形成机制还研究得不清楚,引起了很多研究者的兴趣。研究目的在于通过对硅基底表面醛基改性处理后固定RA,并研究烘干处理和喷金等处理,直接观察RA的生物膜结构。结果表明醛基化硅表面能有效地固定RA,经60℃烘干处理,喷金5秒可以清楚地观察到RA的生物膜结构,与常规的磷钨酸染色法相比具有耗时短、操作简便等优点,为生物膜进一步研究提供了新的方法学。

## 关键词

里默氏杆菌, 生物膜, 扫描电镜

Copyright © 2019 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)在我国广泛存在,且有多达21种血清型[1]。里默氏菌没有鞭毛和纤毛等附属结构,有报道包括外膜蛋白和外毒素等具有毒力贡献[2] [3] [4]。胡青海等[5]在2013年揭示了RA生物膜形成的规律,且证明它也是里默氏菌的毒力因子,这引起了很多研究者的兴趣[6]。细菌生物膜的主要成份是多糖物质[7],含水量高达90%以上,与染料的亲和力弱,塌陷或者皱缩产生形变[8],通常将菌体和背景分别着色,把不透明的生物膜衬托出来以便于观察,但普通显微镜观察生物膜效果不理想[9]。另一种方法是负染法再行电子显微镜观察,由于细菌带负电荷[7],需要采用较强电子散射能力和易被生物吸附的试剂诸如钼酸铵、四氧化钨、磷钨酸等进行染色,经电子显微镜可以看到普通显微镜下无法看清楚的结构,但该方法需要制片、高锰酸钾氧化、水洗、草酸漂白、水洗、95%酒精分化、烘干、二甲苯固封等步骤,程序复杂,操作繁琐。本研究是在基底表面(玻璃或者硅片基底)进行化学改性处理,可以直接在基底表面固定RA,经适当条件优化可行SEM/TEM观察,具有耗时少、操作简单等优点。

## 2. 试剂和方法

### 2.1. 试剂

3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)购买自上海远慕生物公司;戊二醛购买自山西益鑫泰生物科技有限公司;其它试剂均属分析纯,购买自重庆川东化工有限公司;里默氏杆菌(RA)为本实验室分离保存;磷钨酸染色SEM观察在陆军军医大学电镜中心完成;醛基化表面固定SEM观察在重庆科技学院大型仪器共享中心完成。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 细菌的分离和纯化参照文献[10]的方法执行。

“在无菌条件下将病死鸭脑组织接种于巧克力营养琼脂平板,置蜡烛缸中37℃培养24h,可疑菌落用巧克力琼脂平板纯化及扩大培养[3]。”

#### 2.2.2. 常规染色光学显微镜观察

细菌的生物膜观察经常性使用干墨水负染法染色,其程序为①加一滴60g/l葡萄糖液于洁净载玻片

的一端，然后挑取少量菌体与其混合，再加一环墨水，充分混匀；②另取一端边缘光滑的载玻片作推片，将一端边缘置于混合液前方，然后稍向后拉，当片与混合液接触后，轻轻左右移动，使之沿片接触的后缘散开，尔后以大约 30°角迅速将混合液推向玻片另一端，使混合液铺成薄层；③空气中自然干燥；④用甲醇浸没涂片固定 1 min，弃去甲醇；⑤在酒精灯上方用文火干燥；⑥用甲基紫染 1~2 min；⑦用自来水轻轻冲洗，自然干燥；⑧高倍镜或油镜检查。

### 2.2.3. 磷钨酸染色电子显微镜观察

样品制作程序为：①收集/离心菌体。②清洗菌体。③固定菌体。按常规方法脱水。2.5%戊二醛溶液固定 2~4 h → 磷酸缓冲液清洗 3 次 → 1%锇酸 4~6 h → 缓冲液清洗 3 次 → 乙醇梯度脱；④临界点干燥。⑤离子溅射金。⑥SEM 观察。

### 2.2.4. 醛基化玻片固定电子显微镜观察

硅片在  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  ( $V/V = 3:1$ ) 中氧化 30 分钟，去离子水清洗 3 次，得到氧化硅片。在  $\text{APTES}/\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $V/V = 1:15$ ) 混合溶液中反应 2 小时，先用乙醇清洗 3 次，再用 PBS 清洗 3 次。硅片在戊二醛/PBS 溶液中反应 1.5 小时后，先用 PBS 清洗，再用去离子水清洗 3 次，制成的玻片。然后稀释菌液，调整到  $1 \times 10^5$  CUF 含量，滴加在玻片基底表面，自然阴干，放干燥箱烘干若干时间，制备好的样品经喷金处理直接观察。

## 3. 结果

### 3.1. 光学显微镜观察

从图 1 可见，常规染色 RA 图像只能呈现黑色的模糊背影，菌体呈现较好的形态，但细菌产生生物膜的时间和厚度很不一样，还要视具体的染色操作技术的熟练程度而论。因此，此种方法的效果并不能很好地观察到 RA 的生物膜结构。



**Figure 1.** Optical observation of RA dyed by conventional method. 1000× amplification  
**图 1.** RA 常规染色光镜图 1000×

### 3.2. 磷钨酸染色 SEM 观察

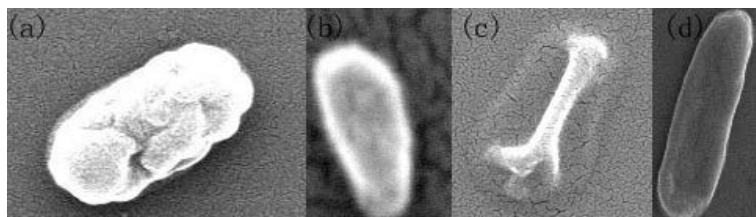
实验中我们将细菌严格按照既定操作程序处理。如图 2 所示，RA 在 SEM 图像中显示无菌毛和鞭毛等附属结构，菌体经放大 15,000 倍，大小  $2\sim 3 \times 3\sim 5 \mu\text{m}$ 。从图中我们可以看到图像的背景，而 RA 轮廓清晰可见，这是由于染液中某些电子密度高的物质包埋低电子密度的样品，但仍然不能很好地呈现生物膜结构。利用扫描电镜可以对细菌的附属结构，例如菌毛、鞭毛等清晰观察，但电子显微重依赖电子的穿透作用，而生物样品一般导电性能差，因此成像效果较差。



**Figure 2.** SEM observation of RA dyed by phosphato-tungstic acid.15000× amplification  
**图 2.** RA 的常规染色 SEM 图像 15000×

### 3.3. 醛基化硅片 SEM 观察

RA 在戊二醛表面直接固定，在 SEM 图像中呈现清晰的图像(图 3)。为了获得更清晰的图像，我们对 RA 进行了喷金处理，如图 3a 为常规染色法获得的 SEM 图像，而图 3b 为经过优化后获得的 SEM 图像，可以看出，在菌体外围出现一层明显的透明圈，应该归于 RA 生物膜结构由于干燥或者喷金发生与菌体龟裂的结果。喷金可以明显提高样品的导电性，增强图像对比度和清晰度。研究发现，喷金时间对成像结果很重要。金膜太厚会掩盖样品的表面细节，太薄样品的导电性差，都会影响观察结果。研究证明结果表明，喷金 5~20 秒可以得到满意的效果。细菌表面有蛋白质和糖基等结构固定，可以通过不同的连接方法进行固定。不同修饰方法对于蛋白质的固定能力也不同。

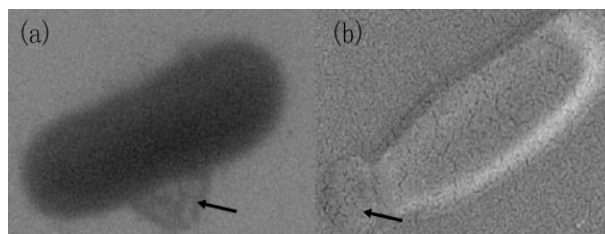


**Figure 3.** SEM observation of RA directly treated by gold-spray and tethered on silicon substrate 20,000× amplification  
**图 3.** 对 RA 喷金处理得到的 SEM 图像 20,000×

经过优化，我们发现以 60℃加热 30 分钟，喷金 5 秒会获得满意的效果。值得注意的是，喷金过渡会使 RA 菌体龟裂，产生质壁分离。SEM 观察时，高对比度使图像富有立体感，但是对比度太高也会损失一些细微的结构。我们还意外地捕捉到 RA 赘生物在菌体侧壁和顶端分别出芽生长的情况，这为揭开 RA 分裂方式提供了有益的佐证。如图 4 所示，在 RA 的侧面和顶部分别捕捉到附着的赘生物。

## 4. 讨论

由于细菌菌体本身的生物属性及蛋白质、脂肪、糖等化学本质，以及荚膜并不依赖微生物的严格养分，即使添加更多的糖分对 RA 大罐发酵得到的菌体也是如此，细胞壁与细胞内容物之间并不能很好地进行区分，更不能把荚膜结构与细胞膜严格区分开来[11]。荚膜主要与细菌的毒力与黏附性能等有关，胡青海等认为生物膜可能跟基因有关[12]。因此，即使采用常规的经典的染色处理 RA 再行高分辨的 SEM 观察，也不能很好地观察到 RA 的荚膜结构。用磷酸钨酸染色，由于染色液的溶剂、离子组成、亲水性、



**Figure 4.** SEM of RA's neoplasm tethered (a) on the side and (b) on the top (arrow noted)

**图 4.** RA 赘生物的 SEM 图像(a)侧面附着, (b)顶端附着

PH 值等变化都有可能引起有缺陷的 SEM 图像。样品的亲水性也是容易引起负染色缺陷重要原因, 当亲水性好的时候, 负染色结果经常显示背景差, 且样品浓度得不到真实显示。我们采用直接在醛基化硅片表面固定 RA, 经适当的加热和喷金处理, 可以获得较清晰的 RA 菌体及其荚膜等附属结构的 SEM 图像。韦强等[13] 2005 年提取了 RA II 赘生物, 并得到有关 RA 赘生物的 SEM 图像。研究还获得了 RA 赘生物从不同的菌体部位释放 SEM 图像, 这为揭开 RA 赘生物的毒力贡献具有方法学价值。

## 5. 结论

硅片表面经醛基化处理可以共价固定里默氏杆菌, 在 60℃ 烘干 30 分钟喷金 5 秒, 可以直接用 SEM 观察到表面的生物膜结构, 与常规染色与磷钨酸染色比较具有图像更清晰, 耗时短, 容易操作等特点, 可以为 RA 研究提供新的方法学。

## 基金项目

研究得到重庆市科委民生项目(cstc2016shmszx0600)和工业发酵微生物重庆市重点实验室开放基金资助(LIFM201712), 以及重庆市教委科技项目 KJZD-K201806401 和 KJ1605701 与 KJ1505901 资助。

## 参考文献

- [1] 黄承洪, 李继祥, 黄伟, 等. 重庆和四川地区鸭疫里默氏杆菌流行动态研究[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(1), 67-70.
- [2] Crasta, K.C., Chua, K.L., Subramaniam, S., Frey, J., Loh, H. and Tan, H.-M. (2002) Identification and Characterization of CAMP Cohemolysin as a Potential Virulence Factor of *Riemerella anatipestifer*. *Journal of Bacteriology*, **184**, 1932-1939. <https://doi.org/10.1128/JB.184.7.1932-1939.2002>
- [3] Weng, S.-C., Lin, W.-H., Chang, Y.-F. and Chang, C.-F. (1999) Identification of a Virulence-Associated Protein Homolog Gene and ISRa1 in a Plasmid of *Riemerella anatipestifer*. *FEMS Microbiology Letters*, **179**, 11-19. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08701.x>
- [4] Subramaniam, S., Huang, B., Loh, H., et al. (2000) Characterization of a Predominant Immunogenic Outer Membrane Protein of *Riemerella anatipestifer*. *Clinical and Vaccine Immunology*, **17**, 168-174. <https://doi.org/10.1128/CDLI.7.2.168-174.2000>
- [5] Hu, Q., Han, X., Zhou, X., Ding, S., Ding, C. and Yu, S. (2010) Characterization of Biofilm Formation by *Riemerella anatipestifer*. *Veterinary Microbiology*, **144**, 429-436. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.023>
- [6] Huang, C., Li, J., Tang, Y., Hou, C., Huo, D., Chen, Y. and Jin, G. (2011) Biosensor Based on Imaging Ellipsometry for Sero-Type-Specific Detection of *Riemerella anatipestifer*. *Materials Sciences and Engineering C*, **31**, 1609-1613. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.05.018>
- [7] Corne, J.M., Stroop, C., Bush, A. and Ronita, L. (2002) Carbohydrate Analysis of Bacterial Polysaccharides by High-pH Anion-Exchange Chromatography and Online Polarimetric Determination of Absolute Configuration. *Analytical Biochemistry*, **303**, 176-185. <https://doi.org/10.1006/abio.2002.5582>
- [8] Brian, C. and Wang, Q. (2004) Polysaccharide Processing and Presentation by the MHCII Pathway. *Cell*, **117**, 677-687. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.05.001>
- [9] Sudhamania, R.N. and Tharanathanb, M.S. (2004) Prasada Isolation and Characterization of an Extracellular Polysac-

charide from *Pseudomonas caryophylli* CFR 1705. *Carbohydrate Polymers*, **56**, 423-427.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.03.008>

- [10] 韦强, 鲍国连, 季权安, 等. 鸭疫里氏杆菌形态特征的电镜观察[J]. 畜牧兽医学报, 2004, 35(3): 314-317.
- [11] 孙梦哲, 刘美杉, 陈豪, 等. 肺炎链球菌荚膜染色方法的比较[J]. 基础医学研究, 2017, 31(7): 136-137.
- [12] Hu, Q., Zhu, Y., Tu, J., Yin, Y., Wang, X., Han, X., Ding, C., Zhang, B. and Yu, S. (2013) Identification of the Genes Involved in *Riemerella anatipestifer* Biofilm Formation by Random Transposon Mutagenesis. *PLoS ONE*, **7**, e39805.
- [13] 韦强, 鲍国连, 王一成, 等. 鸭疫里氏杆菌赘生物提取及其理化特性研究[J]. 浙江大学学报, 2005, 31(3): 250-254.

**知网检索的两种方式:**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2327-0810, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [amb@hanspub.org](mailto:amb@hanspub.org)