

学校编码: 10384

密级_____

学 号: 20051403169

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

海洋细菌生物膜的形成机制与影响因素

Study on Mechanisms and Factors Involved in

Marine Bacterial Biofilm Formation

郭 峰

指导教师姓名: 柯才焕 教授

专 业 名 称: 海洋生物学

论文提交日期: 2009 年 11 月

论文答辩时间: 2009 年 12 月

2009 年 12 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目 录

| | |
|------------------------------------|----|
| 摘要..... | I |
| 摘要（英文）..... | IV |
| 绪 论..... | 1 |
| 第一章 影响海洋细菌粘附的因素..... | 6 |
| 第一节 引言..... | 6 |
| 1.1.1 细菌粘附的过程..... | 6 |
| 1.1.2 关于细菌粘附的现有理论和细胞特征相关的影响因素..... | 6 |
| 1.1.2.1 DLVO 理论..... | 6 |
| 1.1.2.2 细胞疏水性..... | 8 |
| 1.1.2.3 细菌运动速度..... | 9 |
| 1.1.2.4 胞外多聚物..... | 10 |
| 1.1.3 影响细菌粘附的环境因素..... | 10 |
| 1.1.3.1 水中离子强度..... | 10 |
| 1.1.3.2 条件化膜..... | 11 |
| 1.1.3.3 盐度..... | 12 |
| 1.1.3.4 pH..... | 13 |
| 1.1.3.5 二价离子..... | 13 |
| 1.1.3.6 其他环境因素..... | 14 |
| 1.1.4 本章研究内容..... | 14 |
| 第二节 海洋细菌粘附能力与其自身特征的相关性..... | 15 |
| 1.2.1 材料与方法..... | 15 |
| 1.2.1.1 实验菌株及培养基..... | 15 |
| 1.2.1.2 细胞形态..... | 15 |
| 1.2.1.3 运动速度..... | 15 |
| 1.2.1.4 细胞疏水性..... | 16 |
| 1.2.1.5 EPS 蛋白与多糖组分..... | 16 |
| 1.2.1.6 细菌 zeta 电位的测定..... | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 1.2.1.7 粘附实验..... | 17 |
| 1.2.1.8 数据处理..... | 17 |
| 1.2.2 结果..... | 17 |
| 1.2.2.1 菌株特征基本数据..... | 17 |
| 1.2.2.2 细菌单一特征与其粘附能力的相关性分析..... | 25 |
| 1.2.3. 讨论..... | 28 |
| 第三节 条件膜及水化学因素对于细菌在海水中粘附的影响..... | 32 |
| 1.3.1 材料与方法..... | 32 |
| 1.3.1.1 菌株与培养基..... | 32 |
| 1.3.1.2 附着基底..... | 33 |
| 1.3.1.3 条件膜的制备..... | 33 |
| 1.3.1.4 各种人工海水的配制..... | 33 |
| 1.3.1.5 细菌粘附实验..... | 34 |
| 1.3.1.6 数据统计..... | 34 |
| 1.3.2 结果..... | 38 |
| 1.3.3 讨论..... | 40 |
| 第二章 海洋细菌生物膜形成的影响因素..... | 40 |
| 第一节 引言..... | 40 |
| 2.1.1 生物膜形成的一般过程..... | 40 |
| 2.1.2 研究生物膜形成的方法..... | 41 |
| 2.1.2.1 成膜方法..... | 41 |
| 2.1.2.2 可视化（显微）方法..... | 43 |
| 2.1.2.3 生物膜的定量方法..... | 46 |
| 2.1.3 主要模式细菌..... | 49 |
| 2.1.3.1 铜绿假单胞杆菌..... | 49 |
| 2.1.3.2 霍乱弧菌..... | 50 |
| 2.1.3.3 大肠杆菌..... | 50 |
| 2.1.3.4 葡萄球菌..... | 51 |
| 2.1.4 海洋生物膜研究的现状..... | 51 |
| 2.1.4.1 海洋生物膜的分布..... | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1.4.2 污损问题..... | 52 |
| 2.1.5 本章研究内容和研究意义..... | 54 |
| 2.1.5.1 环境因素对海洋细菌生物膜形成的影响..... | 54 |
| 2.1.5.2 不同粗糙度不锈钢表面的生物膜形成的影响..... | 55 |
| 2.1.5.3 杂色鲍足粘液对细菌生物膜形成影响..... | 56 |
| 2.1.5.4 防污涂料表面天然细菌生物膜的群落组成..... | 57 |
| 第二节 海水条件对海洋细菌生物膜形成的影响..... | 59 |
| 2.2.1 材料与方法..... | 59 |
| 2.2.1.1 菌株及培养基..... | 59 |
| 2.2.1.2 实验设计..... | 59 |
| 2.2.1.3 环境因素影响细菌生物膜形成..... | 59 |
| 2.2.1.4 环境因素影响细菌粘附..... | 59 |
| 2.2.1.5 环境因素影响细菌粘附态生长..... | 60 |
| 2.2.1.6 环境因素影响生物膜脱落..... | 60 |
| 2.2.1.7 数据分析..... | 60 |
| 2.2.2 结果..... | 61 |
| 2.2.2.1 32 株细菌在各环境条件下的成膜..... | 61 |
| 2.2.2.2 环境因素对生物膜形成过程的三个方面的影响..... | 66 |
| 2.2.3 讨论..... | 74 |
| 第三节 一株溶藻弧菌在流动培养体系下形成生物膜的结构研究..... | 77 |
| 2.3.1 材料与方法..... | 77 |
| 2.3.1.1 菌株与培养基..... | 77 |
| 2.3.1.2 生物膜培养方法..... | 78 |
| 2.3.1.3 实验条件设置..... | 79 |
| 2.3.1.4 取样与观察..... | 80 |
| 2.3.1.5 生物膜荧光图像的分析..... | 81 |
| 2.3.1.6 Ca 和 Mg 对溶藻弧菌生物膜形成影响机制..... | 81 |
| 2.3.2 结果..... | 82 |
| 2.3.2.1 溶藻弧菌在各环境条件下的成膜..... | 82 |
| 2.3.2.2 二价离子对溶藻弧菌生物膜形成的影响机制..... | 90 |

| | |
|---|-----|
| 2.3.2.3 溶藻弧菌与铜绿假单胞杆菌的双菌种生物膜生长..... | 92 |
| 2.3.3 讨论..... | 93 |
| 第四节 不同粗糙度不锈钢表面生物膜的形成..... | 96 |
| 2.4.1 材料与方法..... | 96 |
| 2.4.1.1 菌株与培养基..... | 96 |
| 2.4.1.2 不同粗糙度不锈钢片的制备..... | 97 |
| 2.4.1.3 细菌在不同粗糙度不锈钢表面的粘附..... | 97 |
| 2.4.1.4 <i>Alteromonas</i> sp. 在不同粗糙度不锈钢表面形成生物膜的特征..... | 98 |
| 2.4.1.5 <i>P. flavipulchra</i> 在不同粗糙度不锈钢片表面繁殖和运动能力..... | 98 |
| 2.4.1.6 数据处理..... | 100 |
| 2.4.2 结果..... | 101 |
| 2.4.2.1 海洋污损细菌在不同粗糙度不锈钢表面的粘附..... | 101 |
| 2.4.2.2 在不同粗糙度不锈钢片上生物膜形成..... | 103 |
| 2.4.2.3 在不同粗糙度不锈钢表面的粘附态细菌的繁殖和运动..... | 105 |
| 2.4.4 讨论..... | 107 |
| 第五节 鲍足粘液对细菌生长、粘附、生物膜形成及群落组成的影响..... | 110 |
| 2.5.1 材料与方法..... | 110 |
| 2.5.1.1 菌株与培养基..... | 110 |
| 2.5.1.2 足粘液影响细菌的生长..... | 111 |
| 2.5.1.3 足粘液影响细菌的粘附..... | 111 |
| 2.5.1.4 足粘液影响生物膜形成..... | 112 |
| 2.5.1.5 足迹内的 CFU 变化..... | 112 |
| 2.5.1.6 DGGE 方法比较足迹内和洁净基底上细菌群落组成变化..... | 113 |
| 2.5.1.7 数据处理..... | 113 |
| 2.5.2 结果..... | 113 |
| 2.5.2.1 足粘液影响细菌的生长..... | 113 |
| 2.5.2.2 足粘液对细菌粘附的影响..... | 115 |
| 2.5.2.3 足粘液影响细菌生物膜形成..... | 116 |
| 2.5.2.4 足迹内的活菌数量变化..... | 116 |
| 2.5.2.5 足粘液内细菌群落组成变化分析..... | 119 |

| | |
|--|------------|
| 2.5.3 讨论..... | 119 |
| 第六节 九龙江口海洋防污涂料表面生物膜细菌组成的群落分析..... | 122 |
| 2.6.1 材料与方法..... | 122 |
| 2.6.1.1 实验取样地点..... | 122 |
| 2.6.1.2 挂片制作及涂料喷涂..... | 122 |
| 2.6.1.3 实验设计..... | 122 |
| 2.6.1.4 DNA 提取..... | 123 |
| 2.6.1.5 PCR | 123 |
| 2.6.1.6 DGGE..... | 124 |
| 2.6.1.7 测序..... | 124 |
| 2.6.1.8 数据分析..... | 125 |
| 2.6.2 结果..... | 125 |
| 2.6.2.1 水文数据..... | 125 |
| 2.6.2.2 DGGE..... | 126 |
| 2.6.2.3 序列分析..... | 128 |
| 2.6.3 讨论..... | 132 |
| 第三章 海洋细菌生物膜的抗逆性..... | 135 |
| 第一节 引言..... | 135 |
| 3.1.1 生物膜中的细菌对不利环境因素的防御..... | 135 |
| 3.1.1.1 抵抗与耐受..... | 135 |
| 3.1.1.2 EPS 的防化学物质渗透作用..... | 136 |
| 3.1.1.3 生物膜中代谢不活跃细胞..... | 138 |
| 3.1.1.4 粘附细胞的先天抗逆性..... | 138 |
| 3.1.2 本章研究内容及目的意义..... | 139 |
| 3.1.2.1 不同营养和压力条件下初始粘附细菌的生长速度研究..... | 139 |
| 3.1.2.2 海洋细菌生物膜对多种极端环境压力的耐受..... | 140 |
| 第二节 不同营养和压力条件下初始粘附细菌的生长速度研究..... | 141 |
| 3.2.1 材料与方法..... | 141 |
| 3.2.1.1 菌株与培养基..... | 141 |
| 3.2.1.2 繁殖速度的测定方法..... | 142 |

| | |
|--|------------|
| 3.2.1.3 实验方法准确性的测定..... | 142 |
| 3.2.1.4 不同营养物浓度对悬浮态和粘附态细菌生长的影响..... | 143 |
| 3.2.1.5 不同不利环境因素对悬浮态和粘附态细菌的繁殖速度的影响...143 | |
| 3.2.1.6 数据处理..... | 143 |
| 3.2.2 实验结果..... | 144 |
| 3.2.2.1 研究方法准确性评估..... | 144 |
| 3.2.2.2 不同营养浓度下悬浮态与粘附态细菌的繁殖速度..... | 145 |
| 3.2.2.3 不同环境因素对 <i>Pseudomonas</i> sp.悬浮态和粘附态细菌的繁殖速度的影响..... | 147 |
| 3.2.3 讨论..... | 149 |
| 3.2.3.1 实验方法学..... | 149 |
| 3.2.3.2 营养条件对悬浮细菌及粘附细菌生长的影响..... | 150 |
| 3.2.3.3 粘附细菌抗逆性机制探讨..... | 151 |
| 第三节 海洋细菌生物膜对极端环境耐受能力研究..... | 153 |
| 3.3.1 材料与方法..... | 153 |
| 3.3.1.1 菌株与培养基..... | 153 |
| 3.3.1.2 悬浮细菌及生物膜的培养..... | 153 |
| 3.3.1.3 假弧菌悬浮菌和粘附细菌对低渗的耐受比较..... | 154 |
| 3.3.1.4 溶藻弧菌悬浮细胞与生物膜对干燥的耐受..... | 154 |
| 3.3.1.5 溶藻弧菌悬浮细胞与生物膜对贫营养的耐受..... | 155 |
| 3.3.1.6 溶藻弧菌悬浮细胞与生物膜对毒性金属和抗生素的耐受..... | 155 |
| 3.3.2 结果..... | 156 |
| 3.3.2.1 悬浮菌和生物膜中的细菌对低渗的耐受..... | 156 |
| 3.3.2.2 悬浮细胞与生物膜对干燥的耐受..... | 159 |
| 3.3.2.3 悬浮细胞与生物膜对长时间贫营养的耐受..... | 160 |
| 3.3.2.4 悬浮细胞与生物膜对毒性金属和抗生素的耐受..... | 163 |
| 3.3.3 讨论..... | 164 |
| 3.3.3.1 生物膜对低渗的耐受..... | 165 |
| 3.3.3.2 生物膜对干燥的耐受..... | 166 |
| 3.3.3.3 生物膜对贫营养环境的耐受..... | 167 |

| | |
|---------------------------------|-----|
| 3.3.3.4 海洋生物膜对高毒重金属与抗生素的耐受..... | 168 |
| 参考文献..... | 170 |
| 本文创新点，研究不足与展望..... | 197 |
| 攻读博士学位期间发表的论文..... | 199 |
| 致谢..... | 200 |
| 附录..... | 202 |

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Content

| | |
|--|----|
| Abstract (in Chinese)..... | I |
| Abstract (in English)..... | IV |
| Exordium..... | 1 |
| Chapter 1 Factors involved in marine bacterial attachment..... | 6 |
| Section 1 Introduction..... | 6 |
| 1.1.1 Processes of bacterial attachment..... | 6 |
| 1.1.2 Cell characteristics involved in bacterial attachment..... | 6 |
| 1.1.2.1 DLVO theory..... | 6 |
| 1.1.2.2 Cell hydrophobicity..... | 8 |
| 1.1.2.3 Swimming motility..... | 9 |
| 1.1.2.4 Extracellular polymer substances..... | 10 |
| 1.1.3 Environmental factors involved in marine bacterial attachment..... | 10 |
| 1.1.3.1 Ion strength..... | 10 |
| 1.1.3.2 Conditioning film..... | 11 |
| 1.1.3.3 Salinity..... | 12 |
| 1.1.3.4 pH..... | 13 |
| 1.1.3.5 Divalent cations..... | 13 |
| 1.1.3.6 Other factors..... | 14 |
| 1.1.4 Contents and intentions of studies in this chapter..... | 14 |
| Section 2. Correlations of some marine bacterial characteristics with their ability to attach..... | 15 |
| 1.2.1 Materials and methods..... | 15 |
| 1.2.1.1 Bacterial strains and media..... | 15 |
| 1.2.1.2 Measurement of cell shape..... | 15 |
| 1.2.1.3 Measurement of swimming speed..... | 15 |
| 1.2.1.4 Measurement of cell hydrophobicity..... | 16 |
| 1.2.1.5 Contents of protein and polysaccharide in EPS..... | 16 |
| 1.2.1.6 Measure of bacterial zeta potential..... | 17 |
| 1.2.1.8 Bacterial attachment assays..... | 17 |
| 1.2.1.8 Data analysis..... | 17 |

| | |
|--|----|
| 1.2.2 Results..... | 17 |
| 1.2.2.1 Characteristics of the tested bacteria..... | 17 |
| 1.2.2.2 Correlations of certain bacterial characteristic with their ability to attach..... | 25 |
| 1.2.3 Discussion..... | 28 |
| Section 3 Effects of conditioning films and environmental factors on bacterial attachment in seawater..... | 32 |
| 1.3.1 Materials and methods..... | 32 |
| 1.3.1.1 Strains and media..... | 32 |
| 1.3.1.2 Substratum..... | 33 |
| 1.3.1.3 Preparation of conditioning films..... | 33 |
| 1.3.1.4 Preparation of different seawater treatments..... | 33 |
| 1.3.1.5 Bacterial attachment assays..... | 33 |
| 1.3.1.6 Data analysis..... | 34 |
| 1.3.2 Results..... | 34 |
| 1.3.3 Discussion..... | 38 |
| Chapter 2 Factors involved in marine bacterial biofilm formation..... | 40 |
| Section 1 Introduction..... | 40 |
| 2.1.1 Common steps of biofilm formation..... | 40 |
| 2.1.2 Methods to study biofilm formation..... | 41 |
| 2.1.2.1 Culture methods..... | 41 |
| 2.1.2.2 Microscopy..... | 43 |
| 2.1.2.3 Biomass quantification..... | 46 |
| 2.1.3 Main typical bacteria in researches of biofilm formation..... | 49 |
| 2.1.3.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 49 |
| 2.1.3.2 <i>Vibrio cholerae</i> | 50 |
| 2.1.3.3 <i>E. coli</i> | 50 |
| 2.1.3.4 <i>Staphylococcus</i> spp..... | 51 |
| 2.1.4 Researches about marine biofilm formation..... | 51 |
| 2.1.4.1 Distribution of marine biofilm..... | 51 |
| 2.1.4.2 Biofouling..... | 52 |
| 2.1.5 Contents and intentions of studies in this chapter..... | 54 |
| 2.1.5.1 Effects of environmental factors on marine biofilm formation..... | 54 |

| | |
|--|----|
| 2.1.5.2 Biofilm formation on stainless steel coupons with various roughness..... | 55 |
| 2.1.5.3 Biofilm formation on pedal mucus of <i>Haliotis diversicolor</i> | 56 |
| 2.1.5.4 Bacterial community structure on antifouling paints..... | 57 |
| Section 2 Marine bacterial biofilm formation on various seawaters..... | 59 |
| 2.2.1 Materials and methods..... | 59 |
| 2.2.1.1 Strains and media..... | 59 |
| 2.2.1.2 Designation of the assays | 59 |
| 2.2.1.3 Effects of environmental factors on marine biofilm formation..... | 59 |
| 2.2.1.4 Effects of environmental factors on attachment of marine bacteria...59 | |
| 2.2.1.5 Effects of environmental factors on bacterial sessile growth..... | 60 |
| 2.2.1.6 Effects of environmental factors on detachment of biofilm..... | 60 |
| 2.2.1.7 Data analysis..... | 60 |
| 2.2.2 Results..... | 61 |
| 2.2.2.1 Biofilm formation of 32 bacterial strains in various seawaters..... | 61 |
| 2.2.2.2 Effects of the environmental factors on the three steps of biofilm formation..... | 66 |
| 2.2.3 Discussion..... | 74 |
| Section 3 Biofilm structure of <i>vibrio alginolyticus</i> cultured in flow culture system under various conditions..... | 77 |
| 2.3.1 Materials and methods..... | 77 |
| 2.3.1.1 Strains and media..... | 77 |
| 2.3.1.2 Flow culture system..... | 78 |
| 2.3.1.3 Culture conditions involved in this study..... | 79 |
| 2.3.1.4 Sampling and observation..... | 80 |
| 2.3.1.5 Analysis the images of the biofilms..... | 81 |
| 2.3.1.6 Mechanisms of the effects of calcium and magnesium on <i>vibrio alginolyticus</i> biofilm formation | 81 |
| 2.3.2 Results..... | 82 |
| 2.3.2.1 Biofilm structure of <i>vibrio alginolyticus</i> under various seawaters..... | 82 |
| 2.3.2.2 Mechanisms of the effects of calcium and magnesium on <i>vibrio alginolyticus</i> biofilm formation..... | 90 |
| 2.3.2.3 Dual species biofilm formation..... | 92 |
| 2.3.3 Discussion..... | 93 |

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库