

# 聚苯乙烯微塑料对肺炎克雷伯菌生长、生物膜形成和毒力的影响

程振富<sup>1,2</sup>, 白森<sup>2</sup>, 白宇超<sup>2</sup>, 赵乾秀<sup>2</sup>, 王正豪<sup>2</sup>, 张灿<sup>2</sup>, 张传福<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 安徽医科大学公共卫生学院卫生检验与检疫学系, 合肥 230032;

<sup>2</sup> 中国人民解放军疾病预防控制中心, 北京 100071)

**摘要** 目的 探究聚苯乙烯微塑料(PS-MPs)对肺炎克雷伯菌生长、活性、氧化应激水平、生物膜形成和毒力的影响。方法 肺炎克雷伯菌暴露在不同浓度(10、50和100  $\mu\text{g/ml}$ )和粒径(0.1、1.0和5.0  $\mu\text{m}$ )的PS-MPs环境下,测定生长曲线;通过CCK-8测定细菌活性;荧光探针法测定胞内活性氧(ROS)水平;结晶紫染色法测定生物膜形成能力;使用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测生物膜形成相关基因(*luxS*、*mrkA*、*wbbM*、*pgaA*、*wzm*)和毒力基因(*ureA*、*uge*、*wabG*、*fimH*)的相对表达水平。结果 高浓度(100  $\mu\text{g/ml}$ )的0.1  $\mu\text{m}$  PS-MPs对肺炎克雷伯菌的生长和活性具有更强的抑制作用,胞内ROS水平显著提升,表明粒径越小、浓度越高的PS-MPs对细菌的毒性越强。100  $\mu\text{g/ml}$ 各粒径组(0.1、1.0和5.0  $\mu\text{m}$ )的PS-MPs显著促进肺炎克雷伯菌的生物膜形成,提高生物膜形成相关基因(*luxS*、*mrkA*、*wbbM*、*pgaA*、*wzm*)和毒力基因(*ureA*、*uge*、*wabG*、*fimH*)的相对表达水平。结论 PS-MPs通过诱导肺炎克雷伯菌产生较高水平ROS,引起氧化应激,导致细菌的生长和活性受到抑制,并且增强生物膜形成能力和毒力,从而影响肺炎克雷伯菌的生物学特性。

**关键词** 微塑料;肺炎克雷伯菌;氧化应激;生物膜形成;毒力

**中图分类号** R 114

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)10-1835-07

**doi**:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.020

微塑料(microplastics, MPs)指直径小于5 mm的塑料颗粒,主要由微米级塑料的直接排放或塑料制品的降解破碎而产生<sup>[1]</sup>。MPs作为持久性新污染物,广泛存在于海洋、淡水、土壤、大气以及沉积物等环境介质中<sup>[2]</sup>。其中,聚苯乙烯(polystyrene, PS)是环境中最常检出的MPs类型之一<sup>[3]</sup>。肺炎克雷伯菌属于革兰阴性条件致病菌,可引起菌血症、肺炎和肝脓肿等多种感染性疾病<sup>[4]</sup>。肺炎克雷伯菌是水环境中MPs表面的优势病原菌<sup>[5]</sup>,其引起的生态风险值得关注。

微生物在恶劣环境中通过形成生物膜降低外界对自身的毒害<sup>[6]</sup>。*luxS*、*mrkA*、*wbbM*、*pgaA*和*wzm*是肺炎克雷伯菌生物膜形成的相关基因,通过调控群体感应(quorum sensing, QS)、菌毛、胞外聚合物等参与生物膜生成<sup>[7]</sup>。随着细菌聚集形成生物膜,可能引起细菌毒力发生变化<sup>[8]</sup>。*ureA*、*uge*、*wabG*和*fimH*是肺炎克雷伯菌的毒力基因<sup>[9]</sup>。有研究<sup>[10]</sup>指

出MPs表面的肠杆菌菌株具有强生物膜形成和溶血素产出等情况。由此看出,MPs在调控细菌生物膜形成和毒力过程中发挥重要作用。目前,MPs对肺炎克雷伯菌生长、生物膜形成和毒力等生物学特性的影响尚未明确,本研究以肺炎克雷伯菌作为受试菌株,探究聚苯乙烯微塑料(polystyrene microplastics, PS-MPs)对细菌生长、活性、氧化应激水平、生物膜形成和毒力的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株和PS-MPs** 肺炎克雷伯菌 ATCC10031(货号:LA9000-1EA)购自北京索莱宝科技有限公司。PS-MPs(粒径为0.1  $\mu\text{m}$ 、1.0  $\mu\text{m}$ 和5.0  $\mu\text{m}$ )购自天津均益佳科技有限责任公司(货号:6-1-0010、6-1-0100和6-1-0500)。PS-MPs的分散介质为纯水,使用前将其在20  $^{\circ}\text{C}$ 、400 W、40 kHz条件下进行超声处理30 min,超声前后进行涡旋振荡,使悬浮颗粒分散均匀。

**1.2 主要试剂与仪器** LB培养基(货号:CM158)购自北京陆桥技术股份有限公司;细菌活性试剂盒(货号:BB-4221-2)购自上海贝博生物科技有限公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)测定试剂盒(货号:E004-1-1)购自南京建成生物工程研究所;

2024-05-30 接收

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2023YFF0614204);国家自然科学基金项目(编号:52070193)

作者简介:程振富,男,硕士研究生;

张传福,男,研究员,硕士生导师,通信作者,E-mail: hnzcf

@126.com

0.85% NaCl 溶液(货号:IN9004)、PBS 缓冲液(货号:P1020)和0.1%结晶紫(货号:G1063)购自北京索莱宝科技有限公司;甲醇(货号:1000320)购自广东西陇化工股份有限公司;冰醋酸(货号:10000218)购自上海国药集团化学试剂有限公司;细菌总 RNA 提取试剂盒(货号:DP430)、cDNA 第一链合成试剂盒(货号:KR116-02)和 SYBR Green 荧光染料试剂盒(货号:FP205-02)购自天根生化(北京)有限公司;引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。荧光定量 PCR 仪(型号:CFX96)购自美国 Bio-Rad 公司;超微量紫外分光光度计(型号:DS-11+)购自美国 Denovix 公司;全波长酶标仪(型号:Multiskan SkyHigh)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;多功能酶标仪(型号:SpectraMax iD3)购自美国 Molecular Devices 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 菌种培养** 将肺炎克雷伯菌菌株接种于 LB 培养基中,使用恒温振荡培养箱在 37 °C 和 150 r/min 条件下培养 12 h,然后将处于对数期的肺炎克雷伯菌在 4 °C 和 4 500 r/min 条件下离心 15 min 收集菌体,弃去上清液,用 0.85% 的 NaCl 溶液洗涤 3 次以充分去除残留培养基,最后将菌体重悬于 0.85% NaCl 溶液中配制菌悬液,并用超微量紫外分光光度计调节菌悬液吸光度值为  $OD_{600} = 0.5$  (约  $5 \times 10^8$  CFU/ml)。

**1.3.2 生长曲线测定** 生长曲线通过在无菌 96 孔细胞培养板中培养肺炎克雷伯菌并用全波长酶标仪进行测定。各粒径(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ ) PS-MPs 溶液用 LB 培养基配制成不同浓度(10、50、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),以含有等量纯水的 LB 培养基作为对照组(Control 组)。将菌悬液按 1:100 的比例加入到配制好的 LB 培养基中,在 37 °C 条件下进行培养。使用全波长酶标仪在 600 nm 波长条件下测量各孔在 0、0.5、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 的吸光度值。计算各个时间点的  $\Delta OD_{600}$ ,即各时间点的  $OD_{600}$  减去 0 h 时各实验组的  $OD_{600}$ ,若各实验组的  $\Delta OD_{600}$  相较于 Control 组明显降低,则说明 PS-MPs 抑制细菌生长,以培养时间为横坐标, $\Delta OD_{600}$  值为纵坐标,绘制细菌生长曲线。

**1.3.3 活性测定** 采用细菌活性试剂盒,通过 CCK-8 法测定肺炎克雷伯菌的细菌活性。肺炎克雷伯菌暴露于不同浓度(10、50、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )和粒径(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ ) PS-MPs 环境下,在 37 °C 条件下培养 48 h 后,在 96 孔细胞培养板中每孔加入 190

$\mu\text{l}$  各实验组培养后的菌悬液,加入 10  $\mu\text{l}$  染色溶液,在 37 °C 条件下孵育 1 h,使用全波长酶标仪在 450 nm 波长处测量每个孔的吸光度。空白组是未培养细菌的组,Control 组是未暴露于 PS-MPs 的组。活性测定结果表示为与 Control 组的百分比形式。依据下列公式计算细菌活性:细菌活性 =  $[(\text{测试组 OD} - \text{空白组 OD}) / (\text{Control 组 OD} - \text{空白组 OD})] \times 100\%$

**1.3.4 氧化应激测定** 收集暴露于不同浓度(10、50、100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )和粒径(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ ) PS-MPs 环境下 37 °C 条件下培养 48 h 的肺炎克雷伯菌,以 ROS 作为氧化应激程度指标并进行测定。采用荧光探针 DCFH-DA 测定胞内的 ROS 含量。根据 ROS 测定试剂盒说明书进行测定,使用多功能酶标仪读取荧光值,实验结果最后表示为与 Control 组的百分比形式。

**1.3.5 生物膜形成测定** 肺炎克雷伯菌生物膜在无菌 96 孔细胞培养板中进行培养并测定。用 LB 培养基配制不同浓度(10、50 和 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )分散均匀的各粒径(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ ) PS-MPs 溶液,每组做 3 个平行孔,为减少培养液挥发,外围一圈每孔加入适量培养基。置于恒温培养箱中,在 37 °C 条件下培养 48 h 后,弃去培养基,然后用 PBS 缓冲液轻轻洗涤每个测定孔 3 次以充分弃去游离菌。将孔板晾干,随后每孔用 200  $\mu\text{l}$  甲醇固定 20 min,弃去甲醇,用 PBS 缓冲液轻轻洗涤测定孔 3 次。晾干后每孔加入 200  $\mu\text{l}$  0.1% 结晶紫溶液染色 30 min,弃去染液,用 PBS 缓冲液轻轻洗涤测定孔 3 次。晾干后每个测定孔加入 200  $\mu\text{l}$  33% 的冰醋酸并充分振荡 20 min。最后使用全波长酶标仪在 570 nm 处测量每个孔的吸光度,实验结果表示为与 Control 组的百分比形式。

**1.3.6 生物膜形成相关基因相对表达水平测定** 采用 qRT-PCR 检测肺炎克雷伯菌的生物膜形成相关基因 luxS、mrkA、wbbM、pgaA 和 wzm 的相对表达水平。引物序列参照文献进行合成<sup>[7]</sup>,见表 1。将菌悬液按 1:100 的比例加在含或不含 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  各粒径(0.1、1.0、5.0  $\mu\text{m}$ ) PS-MPs 的培养基,未暴露于 PS-MPs 的组是 Control 组,随后使用恒温培养箱在 37 °C 条件下培养 48 h。使用细菌总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,使用 cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录,通过 SYBR Green 荧光染料试剂盒进行扩增。以肺炎克雷伯菌 16S rRNA 作为内参基因<sup>[11]</sup>,结果用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法分析相对基因表达水平。

表1 生物膜相关基因引物序列

Tab.1 Biofilm-related gene primer sequence

Primer name	Primer sequence(5'-3')
16S rRNA	F:AAAGCGTGGGAGCAAACAG R:CCGCTGGCAACAAAGGATAA
LuxS	F:ACTGATGCCGAACGCGG R:CGGTGTACCAATCAGGCTC
mrkA	F:ACGTCTCTAACTGCCAGGC R:TAGCCCTGTTGTTGCTGGT
wbbM	F:ATGCGGGTGAGAACAACCA R:AGCCGCTAACGACATCTGAC
pgaA	F:GCAGACGCTCTCTATGTC R:GCCGAGAGCAGGGAATC
wzm	F:TGCCAGTTCGGCCACTAAC R:GACAACAATAACCGGGATGG

1.3.7 毒力基因相对表达水平测定 使用 qRT-PCR 方法测定肺炎克雷伯菌毒力基因 *ureA*、*uge*、*wabG* 和 *fimH* 的相对表达水平。引物序列参照文献进行合成<sup>[9]</sup>,见表2。内参基因、实验和分析方法同 1.3.6 项。

表2 毒力基因引物序列

Tab.2 Virulence gene primer sequence

Primer name	Primer sequence(5'-3')
<i>ureA</i>	F:ACTGACCCCCGAGAAAAA R:GGACTCCGGATAGTTGAGCTT
<i>uge</i>	F:AAGGCTGCCGTACATACAA R:GCTCATTTGGCTTTCTTGGTG
<i>wabG</i>	F:TAAGGATCAGCCTCGCTATCAG R:ATAGAAGGCAATGTCTCCGA
<i>fimH</i>	F:ATTCACGGACCGATAAACCC R:CGCTATGTAGTTGTTGCTCTGAT

1.4 统计学处理 所有实验至少重复3次,通过 GraphPad Prism 8.0 对数据进行统计学分析和作图,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,并使用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 LSD 检验比较各组之间的显著性差异,

以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PS-MPs 对肺炎克雷伯菌生长曲线的影响

不同浓度(10、50 和 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )和粒径(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ )PS-MPs 对肺炎克雷伯菌生长曲线的影响如图1所示,肺炎克雷伯菌经历滞后期、对数期和稳定生长期。在滞后期(0~2 h),各组 PS-MPs 未对肺炎克雷伯菌的生长产生明显抑制。当肺炎克雷伯菌进入对数期(2~24 h),0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$  的 PS-MPs 在不同浓度条件下均对细菌生长产生抑制效果。当培养时间为 24 h 时,各浓度 0.1  $\mu\text{m}$  PS-MPs 的抑制率为  $(10.77 \pm 1.80)\% \sim (16.58 \pm 1.00)\%$  ( $F = 32.13, P < 0.05$ ),1.0  $\mu\text{m}$  PS-MPs 的抑制率为  $(4.66 \pm 0.81)\% \sim (9.80 \pm 2.52)\%$  ( $F = 15.24, P < 0.05$ ),5.0  $\mu\text{m}$  PS-MPs 的抑制率为  $(6.07 \pm 0.74)\% \sim (9.06 \pm 1.05)\%$  ( $F = 19.99, P < 0.05$ )。24 h 后肺炎克雷伯菌进入稳定生长期,当培养时间为 48 h 时,粒径为 0.1  $\mu\text{m}$  的 PS-MPs 对细菌生长的抑制率呈剂量依赖性增加,不同浓度(10、50 和 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )的抑制率分别为  $(6.24 \pm 1.37)\%$ 、 $(11.40 \pm 2.29)\%$  和  $(22.32 \pm 3.83)\%$  ( $t = 3.12, 5.70$  和  $11.16$ ,均  $P < 0.05$ )。肺炎克雷伯菌暴露在粒径为 1.0  $\mu\text{m}$  PS-MPs 和 5.0  $\mu\text{m}$  PS-MPs 培养 48 h 时,不同浓度之间差异无统计学意义;相较于 Control 组,各浓度组对细菌生长均产生明显的抑制效果,1.0  $\mu\text{m}$  PS-MPs 的抑制率为  $(5.60 \pm 0.74)\% \sim (8.19 \pm 1.30)\%$  ( $F = 17.94, P < 0.05$ ),5.0  $\mu\text{m}$  PS-MPs 的抑制率为  $(4.26 \pm 0.58)\% \sim (5.33 \pm 1.49)\%$  ( $F = 12.87, P < 0.05$ )。相较于 1.0  $\mu\text{m}$  和 5.0  $\mu\text{m}$  粒径组,肺炎克雷伯菌暴露于 0.1  $\mu\text{m}$  的 PS-MPs 后生长受到显著抑制,并且随着暴露浓度增加,抑制效果越明显。

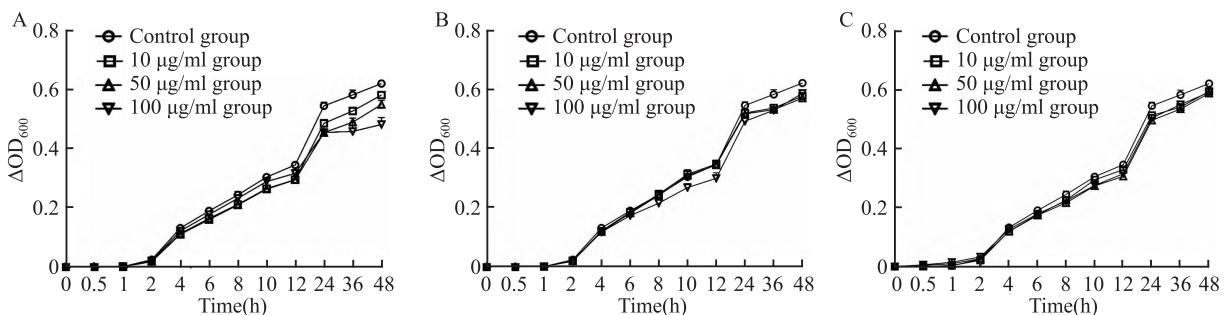


图1 PS-MPs 环境下肺炎克雷伯菌生长曲线

Fig.1 Growth curve of *Klebsiella pneumoniae* in the PS-MPs environmentA-C: 0.1、1.0、5.0  $\mu\text{m}$  PS-MPs.

**2.2 PS-MPs 对肺炎克雷伯菌活性的影响** 不同浓度(10、50 和 100  $\mu\text{g/ml}$ )和粒径(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ )PS-MPs 对肺炎克雷伯菌活性的影响如图 2 所示,细菌活性呈剂量和粒径依赖性下降。低浓度(10  $\mu\text{g/ml}$ )PS-MPs 对细菌活性的抑制效果较轻,与 Control 组相比,各粒径组(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ )细菌活性分别下降了(12.67  $\pm$  3.27)% ( $t = 5.26, P < 0.01$ )、(9.67  $\pm$  4.87)% ( $t = 4.02, P < 0.01$ )和(3.99  $\pm$  0.41)% ( $t = 1.65, P > 0.05$ )。高浓度(100  $\mu\text{g/ml}$ )PS-MPs 对细菌活性产生显著抑制效果,与 Control 组相比,各粒径组(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ )细菌活性分别下降了(39.68  $\pm$  1.03)%、(25.16  $\pm$  1.70)%和(18.79  $\pm$  2.95)% ( $t = 27.07, 17.17$  和 12.82, 均  $P < 0.01$ )。结果显示 PS-MPs 粒径越小,浓度越高,对肺炎克雷伯菌活性的抑制效果越明显。

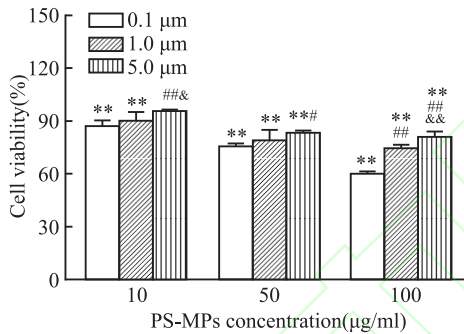


图2 PS-MPs 环境下肺炎克雷伯菌活性水平  
Fig. 2 Activity level of *Klebsiella pneumoniae* in the PS-MPs environment

\*\*  $P < 0.01$  vs Control group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs 0.1  $\mu\text{m}$  group; &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$  vs 1.0  $\mu\text{m}$  group.

**2.3 PS-MPs 诱导胞内 ROS 产生水平** 不同浓度(10、50 和 100  $\mu\text{g/ml}$ )和粒径(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ )PS-MPs 诱导肺炎克雷伯菌产生的胞内 ROS 水平变化如图 3 所示。暴露于 10  $\mu\text{g/ml}$  各粒径组(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ )PS-MPs 48 h 后,细菌产生的胞内 ROS 含量相较于 Control 组分别增加了(22.79  $\pm$  2.79)%、(10.70  $\pm$  1.47)%和(6.25  $\pm$  1.78)% ( $t = 15.30, 7.19$  和 4.19, 均  $P < 0.01$ )。暴露于 100  $\mu\text{g/ml}$  各粒径组(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ )PS-MPs 48 h 后,细菌产生的胞内 ROS 含量相较于 Control 组显著增加,分别增加了(48.08  $\pm$  3.40)%、(22.61  $\pm$  2.27)%和(17.38  $\pm$  2.34)% ( $t = 24.92, 11.72$  和 9.01, 均  $P < 0.01$ )。结果显示 0.1  $\mu\text{m}$  PS-MPs 产生的 ROS 含量显著高于其他粒径组(1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ ),

并且浓度越高,肺炎克雷伯菌产生的氧化应激水平越高。

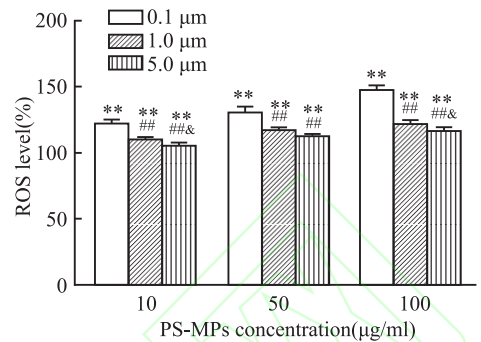


图3 PS-MPs 环境下肺炎克雷伯菌氧化应激水平  
Fig. 3 Oxidative stress levels of *Klebsiella pneumoniae* in the PS-MPs environment

\*\*  $P < 0.01$  vs Control group; ##  $P < 0.01$  vs 0.1  $\mu\text{m}$  group; &  $P < 0.05$  vs 1.0  $\mu\text{m}$  group.

**2.4 PS-MPs 对生物膜的影响** 不同浓度(10、50 和 100  $\mu\text{g/ml}$ )和粒径(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ )PS-MPs 对肺炎克雷伯菌生物膜形成的影响如图 4 所示。当暴露于 10  $\mu\text{g/ml}$  各粒径组(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ )PS-MPs 48 h 后,细菌生物膜形成量相较于 Control 组分别增加了(17.88  $\pm$  1.94)%、(13.30  $\pm$  1.87)%和(9.59  $\pm$  1.73)% ( $t = 13.21, 9.81$  和 7.08, 均  $P < 0.01$ )。当暴露在 100  $\mu\text{g/ml}$  PS-MPs 环境下,各粒径组(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ )的生物膜形成量明显增加,相较于 Control 组分别增加了(106.29  $\pm$  4.12)%、(60.66  $\pm$  4.40)%和(50.93  $\pm$  4.34)% ( $t = 34.79, 19.86$  和 16.67, 均  $P < 0.01$ )。结果表明 0.1  $\mu\text{m}$  PS-MPs 能够有效促进肺炎克雷伯菌生物膜形成,并且浓度越高,生物膜形成能力越强。

**2.5 PS-MPs 对生物膜形成相关基因相对表达水平的影响** 100  $\mu\text{g/ml}$  各粒径组(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ )PS-MPs 对生物膜形成相关基因 luxS、mrkA、wbbM、pgaA 和 wzm 相对表达水平的影响如图 5 所示。与 Control 组相比,在 100  $\mu\text{g/ml}$  各粒径组(0.1、1.0 和 5.0  $\mu\text{m}$ )的 PS-MPs 环境下, luxS、mrkA、wbbM、pgaA 和 wzm 的相对表达水平显著提高。其中 0.1  $\mu\text{m}$  的 PS-MPs 能够产生显著促进效果, luxS、mrkA、wbbM、pgaA 和 wzm 的相对表达水平相较于 Control 组分别增加了(19.93  $\pm$  1.05)%、(136.00  $\pm$  16.56)%、(94.12  $\pm$  11.35)%、(343.78  $\pm$  30.65)%和(178.41  $\pm$  9.51)% ( $t = 20.55, 19.27, 19.96, 23.36$  和 42.26, 均  $P < 0.01$ )。结果表明 0.1

$\mu\text{m}$  PS-MPs 能显著提高生物膜形成相关基因的相对表达水平,促进生物膜形成。

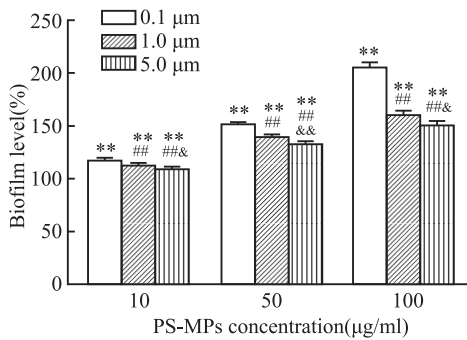


图4 PS-MPs 环境下肺炎克雷伯菌生物膜形成水平

Fig.4 Level of *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation in the PS-MPs environment

\*\*  $P < 0.01$  vs Control group; ###  $P < 0.01$  vs  $0.1 \mu\text{m}$  group; &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$  vs  $1.0 \mu\text{m}$  group.

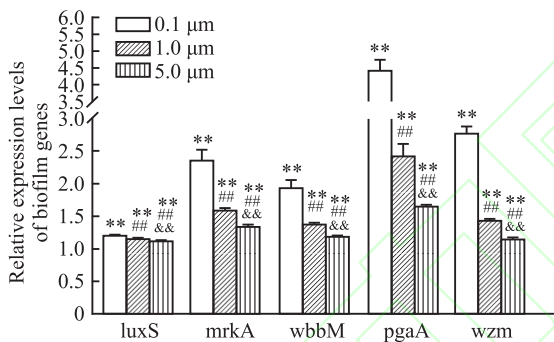


图5 PS-MPs 环境下肺炎克雷伯菌生物膜形成相关基因相对表达水平

Fig.5 Relative expression levels of genes related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* in the PS-MPs environment

\*\*  $P < 0.01$  vs Control group; ###  $P < 0.01$  vs  $0.1 \mu\text{m}$  group; &  $P < 0.01$  vs  $1.0 \mu\text{m}$  group.

## 2.6 PS-MPs 对毒力基因相对表达水平的影响

$100 \mu\text{g/ml}$  各粒径组 ( $0.1$ 、 $1.0$  和  $5.0 \mu\text{m}$ ) PS-MPs 对毒力基因 *ureA*、*uge*、*wabG* 和 *fimH* 相对表达水平的影响如图 6 所示。 $100 \mu\text{g/ml}$  各粒径组 ( $0.1$ 、 $1.0$  和  $5.0 \mu\text{m}$ ) 的 PS-MPs 显著提高 *ureA*、*uge*、*wabG* 和 *fimH* 的相对表达水平。暴露在粒径为  $0.1 \mu\text{m}$  PS-MPs 环境下 48 h 后,毒力基因 *ureA*、*uge*、*wabG* 和 *fimH* 的相对表达水平相较于 Control 组分别增加了 ( $51.56 \pm 2.99$ )%、( $34.60 \pm 2.33$ )%、( $68.23 \pm 4.22$ )% 和 ( $14.21 \pm 1.50$ )% ( $t = 31.66$ 、 $23.35$ 、 $19.78$  和  $3.60$ ,均  $P < 0.01$ )。结果显示 PS-MPs 可以促进肺炎克雷伯菌的毒力基因表达,有助于增强细菌毒力。

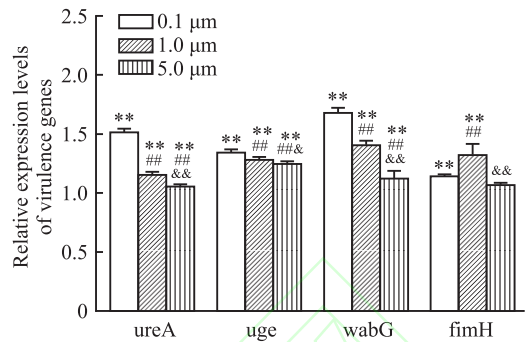


图6 PS-MPs 环境下肺炎克雷伯菌毒力基因相对表达水平

Fig.6 Relative expression levels of virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* in the PS-MPs environment

\*\*  $P < 0.01$  vs Control group; ###  $P < 0.01$  vs  $0.1 \mu\text{m}$  group; &  $P < 0.05$ , &&  $P < 0.01$  vs  $1.0 \mu\text{m}$  group.

## 3 讨论

MPs 污染对全球生态系统和公共卫生产生严重影响,是迫切需要解决的全球环境问题。MPs 和微生物在环境中共存,微生物受到 MPs 刺激后生物学特性可能改变,从而引起生态风险。研究<sup>[12]</sup>表明高水平的氧化应激能激活细胞 MAPK 信号通道,产生脂质过氧化等细胞毒性,最终导致细胞凋亡。在 PS-MPs 环境下,ROS 水平的显著升高可能是导致肺炎克雷伯菌生长抑制和活性降低的重要原因。该研究结果显示 PS-MPs 粒径越小、浓度越大,ROS 含量显著增加,产生更高水平的氧化应激水平,从而对肺炎克雷伯菌生长产生抑制作用,并降低细菌活性。

MPs 具有较强的疏水性、持久性和迁移能力,有利于微生物定殖和生物膜形成<sup>[13]</sup>。研究<sup>[14]</sup>表明生物膜早期形成受到 MPs 粒径影响,由于粒径较小的 MPs 具有更大的比表面积,导致细菌在密闭空间中接触 MPs 的机会更大,更有助于细菌定殖。粒径较大的 MPs 有障碍效应,会阻碍细菌间的接触,减少接触机会,不利于生物膜形成。该研究结果显示,在各粒径组 ( $0.1$ 、 $1.0$  和  $5.0 \mu\text{m}$ ) 中, $0.1 \mu\text{m}$  PS-MPs 能够显著促进肺炎克雷伯菌生物膜形成并提高生物膜形成相关基因 *luxS*、*mrkA*、*wbbM*、*pgaA* 和 *wzm* 的相对表达水平,增强生物膜的形成能力。有研究表明生物膜的形成可以使肺炎克雷伯菌感染宿主能力和抵抗宿主的防御能力增强<sup>[15]</sup>,这可能进一步提升 MPs 的生态风险。此外,细菌生物膜与细菌毒力之间存在密切关系,细菌聚集形成生物膜会增加细菌密度激活 QS,与毒力相关的 QS 信号分子可以调控毒力基因表达<sup>[8]</sup>。该研究表明在 PS-MPs 环境下,

生物膜形成能力增强之后,肺炎克雷伯菌的毒力基因 *ureA*、*uge*、*wabG* 和 *fimH* 相对表达水平升高,有助于细菌毒力的增强。该研究揭示 PS-MPs 可以改变肺炎克雷伯菌的生物膜形成和毒力等生物学特性,这可能会对生态环境稳定和人类健康产生一定的危害。该研究为 MPs 对生态环境和健康风险研究提供数据支持和理论依据。

### 参考文献

- [1] 赵梦婷,秦艺源,邱野,等. 微塑料的环境老化机制及效应研究进展[J]. 环境化学, 2022, 41(8): 2465-77. doi:10.7524/j.issn.0254-6108.2022022301.
- Zhao M T, Qin Y Y, Qiu Y, et al. Environmental aging of microplastic: processes, mechanisms and implications [J]. *Environ Chem*, 2022, 41(8): 2465 - 77. doi:10.7524/j.issn.0254 - 6108.2022022301.
- [2] Wu P F, Huang J S, Zheng Y L, et al. Environmental occurrences, fate, and impacts of microplastics[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 184: 109612. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.109612.
- [3] Mao Y F, Li H, Gu W K, et al. Distribution and characteristics of microplastics in the Yulin River, China: role of environmental and spatial factors[J]. *Environ Pollut*, 2020, 265 (Pt A): 115033. doi:10.1016/j.envpol.2020.115033.
- [4] Wang G Y, Zhao G, Chao X Y, et al. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(17): 6278. doi:10.3390/ijerph17176278.
- [5] Li H, Luo Q P, Zhao S, et al. Watershed urbanization enhances the enrichment of pathogenic bacteria and antibiotic resistance genes on microplastics in the water environment[J]. *Environ Pollut*, 2022, 313: 120185. doi:10.1016/j.envpol.2022.120185.
- [6] Öztürk F Y, Darcan C, Kariptaş E. The determination, monitoring, molecular mechanisms and formation of biofilm in *E. coli* [J]. *Braz J Microbiol*, 2023, 54(1): 259 - 77. doi:10.1007/s42770-022-00895-y.
- [7] Vuotto C, Longo F, Pascolini C, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains[J]. *J Appl Microbiol*, 2017, 123(4): 1003 - 18. doi:10.1111/jam.

13533.

- [8] 周秀娟,索玉娟,黄怡文,等. 生物膜状态对食源性致病菌耐药与毒力的影响研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(16): 104 - 11.
- Zhou X J, Suo Y J, Huang Y W, et al. Research progress on the influence of biofilm status on antibiotic resistance and virulence of foodborne pathogens[J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(16): 104 - 11.
- [9] 王甲,王萍,朱敏立,等. 模拟微重力对肺炎克雷伯菌生物学特性的影响[J]. 军事医学, 2015, 39(2): 92 - 6. doi:10.7644/j.issn.1674-9960.2015.02.004.
- Wang J, Wang P, Zhu M L, et al. Effect of simulated microgravity on biological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Mil Med Sci*, 2015, 39(2): 92 - 6. doi:10.7644/j.issn.1674 - 9960.2015.02.004.
- [10] Silva I, Rodrigues E T, Tação M, et al. Microplastics accumulate priority antibiotic-resistant pathogens: evidence from the riverine plastsphere[J]. *Environ Pollut*, 2023, 332: 121995. doi:10.1016/j.envpol.2023.121995.
- [11] 戴和平. 肺炎克雷伯菌生物膜与耐药及外排泵基因的相关性研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2023. doi:10.26921/d.cnki.ganyu.2023.001596.
- Dai H P. Correlation between biofilm and drug resistance and efflux pump genes of *Klebsiella pneumoniae* [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2023. doi:10.26921/d.cnki.ganyu.2023.001596.
- [12] Hu M, Palić D. Micro- and nano-plastics activation of oxidative and inflammatory adverse outcome pathways [J]. *Redox Biol*, 2020, 37: 101620. doi:10.1016/j.redox.2020.101620.
- [13] Zettler E R, Mincer T J, Amaral-Zettler L A. Life in the "plastsphere": microbial communities on plastic marine debris[J]. *Environ Sci Technol*, 2013, 47(13): 7137 - 46. doi:10.1021/es401288x.
- [14] Qin P, Cui H, Li P X, et al. Early stage of biofilm assembly on microplastics is structured by substrate size and bacterial motility [J]. *Imeta*, 2023, 2(3): e121. doi:10.1002/imt2.121.
- [15] Clegg S, Murphy C N. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(1): 1 - 17. doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012.

## Effects of polystyrene microplastics on the growth, biofilm formation and virulence of *Klebsiella pneumoniae*

Cheng Zhenfu<sup>1,2</sup>, Bai Miao<sup>2</sup>, Bai Yuchao<sup>2</sup>, Zhao Qianxiu<sup>2</sup>, Wang Zhenghao<sup>2</sup>, Zhang Can<sup>2</sup>, Zhang Chuanfu<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Health Inspection and Quarantine, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>2</sup>Chinese People's Liberation Army Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100071)

**Abstract Objective** To explore the effects of polystyrene microplastics (PS-MPs) on the growth, activity, oxidative stress levels, biofilm formation and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Methods** *Klebsiella pneumoniae* was exposed to PS-MPs at different concentrations (10, 50 and 100 µg/ml) and particle sizes (0.1, 1.0 and 5.0

$\mu\text{m}$ ), and the growth curves were measured. The bacterial activity was determined by CCK-8 (cell counting kit-8). The level of intracellular reactive oxygen species (ROS) was determined by fluorescence probe. The biofilm forming ability was determined by crystal violet staining. Real-time quantitative fluorescent PCR (qRT-PCR) was used to detect the relative expression levels of biofilm-forming genes (*luxS*, *mrkA*, *wbbM*, *pgaA*, *wzm*) and virulence genes (*ureA*, *uge*, *wabG*, *fimH*). **Results** A high concentration (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of 0.1  $\mu\text{m}$  PS-MPs had a stronger inhibitory effect on the growth and activity of *Klebsiella pneumoniae*, and the intracellular ROS level significantly increased, indicating that smaller particle size and higher concentration of PS-MPs were more toxic to bacteria. PS-MPs of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  particle size groups (0.1, 1.0 and 5.0  $\mu\text{m}$ ) significantly promoted the biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*. The relative expression levels of biofilm formation related genes (*luxS*, *mrkA*, *wbbM*, *pgaA*, *wzm*) and virulence genes (*ureA*, *uge*, *wabG*, *fimH*) increased. **Conclusion** By inducing *Klebsiella pneumoniae* to produce a high level of ROS, PS-MPs can cause oxidative stress, inhibit the growth and activity of bacteria, and enhance the biofilm formation ability and virulence, thus affecting the biological characteristics of *Klebsiella pneumoniae*.

**Key words** microplastics; *Klebsiella pneumoniae*; oxidative stress; biofilm formation; virulence

**Fund programs** National Key Research and Development Program of China (No. 2023YFF0614204); National Natural Science Foundation of China (No. 52070193)

**Corresponding author** Zhang Chuanfu, E-mail: hnzcf@126.com

(上接第 1834 页)

genes were screened in silicosis patients, among which 62 differentially expressed genes were up-regulated, 142 differentially expressed genes were down-regulated, and 22 differentially expressed genes were mitochondria-targeted. The concentration analysis of differentially expressed genes targeted by mitochondria showed that the cell components mainly enriched included mitochondrial membrane, endoplasmic membrane side components, etc. The biological processes mainly enriched included mitochondrial electron transfer from NADH to ubiquinone, inflammatory response, immune response, etc. The main molecular functions enriched included the rotation mechanism of proton transport ATP synthase activity, NADH dehydrogenase activity, chemokine activity, etc. KEGG enrichment analysis mainly focused on the involvement in chemical carcinogenesis-ROS, IL-17 signaling pathway, toll-like receptor signaling pathway, chemokine signaling pathway, TNF signaling pathway, etc. In addition, RT-qPCR results showed that the expressions of mitochondrial cytochrome oxidase 1, mitochondrial cytochrome oxidase 2, mitochondrial cytochrome oxidase 3, mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1, mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 3, mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 5, superoxide dismutase and mitochondrially encoded ATP synthase 6 gene were down-regulated in silicosis patients ( $P < 0.05$ ). Western blot and RT-qPCR results showed that, in silicosis patients, the expression of MFN1 and OPA1 decreased ( $P < 0.05$ ), while the expression of DRP1 increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Bioinformatics analysis and validation, eight mitochondrial targeted differential genes (MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3, MT-ND1, MT-ND3, MT-ND5, SOD and MT-ATP6) were finally obtained, which were enriched in mitochondrial respiratory chain and oxidative stress pathways and might play an important role in the process of silicosis.

**Key words** silicosis; macrophage; mitochondrial fission; mitochondrial fusion; bioinformatics

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. U21A20334); Natural Science Foundation of Hebei Province (Nos. H2022209021, H2022209039)

**Corresponding author** Liu Heliang, E-mail: liuheliang@ncst.edu.cn