



细胞培养中“黑胶虫”污染的检测及防治*

周怡婷^{1,2)} 高增鸿^{1,2)} 杨嘉文^{1,2)} 汪瑾^{1,2)} 郭雅彬^{1,2)**} 马广伟^{1,2)**}

(1) 广东省恶性肿瘤表观遗传与基因调控重点实验室, 广州 510000; (2) 中山大学孙逸仙纪念医院医学研究中心, 广州 510000)

摘要 很多国内的细胞培养实验室受到“黑胶虫”(或称为“胶虫”、“焦虫”)污染的困扰, 类似的污染在国外通常称为“纳米细菌”(nanobacteria)污染, 但“黑胶虫”/纳米细菌究竟是何物种抑或是一种非生命颗粒, 至今还没有定论. 我们将细胞培养中的污染物从培养基中分离出来, 进行培养和形态学观察, 并利用16S rDNA鉴定技术及VITEK-2微生物鉴定系统对“黑胶虫”进行鉴定, 最后通过抗生素敏感试验及细胞结晶紫染色技术筛选出抑制“黑胶虫”增殖的抗生素及可用于细胞培养的工作浓度. 形态学观察结果显示: “黑胶虫”在普通倒置显微镜下呈点状或片状; 电镜下展示为杆状, 长1 300~1 600 nm, 宽400~500 nm; 在激光共聚焦扫描显微镜400倍镜下进行原地“布朗运动”. 16S rDNA鉴定及VITEK-2微生物鉴定系统结果显示: 本实验室分离的“黑胶虫”为一株短波单胞菌属(*Brevundimonas*)的新菌株, 该菌株与*Brevundimonas diminuta*的相似性为97.8%, 与*Brevundimonas faecalis*的相似性为98.1%. 抗生素敏感试验结果显示: “黑胶虫”对氯霉素(25 mg/L)、红霉素(200 mg/L)和四环素(2.5 mg/L)敏感, 对氨苄青霉素(50 mg/L)、嘌呤霉素(2 mg/L)、青霉素-链霉素双抗(100×)和庆大霉素-两性霉素B双抗(100×)均不敏感. 细胞结晶紫染色结果显示: 细胞培养基中添加一定浓度的氯霉素(25 mg/L)、红霉素(200 mg/L)或四环素(2.5 mg/L)均可抑制细胞培养中“黑胶虫”的增殖, 降低其对细胞增殖的抑制作用. 综上所述, 本研究分离鉴定的“黑胶虫”为一种短波单胞菌, 低浓度的氯霉素、红霉素或四环素均可降低该菌对细胞增殖的抑制作用. 鉴于研究的局限性, 我们不排除“黑胶虫”是其他物种的可能性, 但是本研究为“黑胶虫”的种属鉴定及细胞无菌化培养提供了新的研究思路及方法, 并有望帮助一些实验室解决“黑胶虫”污染的困扰.

关键词 细胞培养, 污染, “黑胶虫”, 纳米细菌, 抗生素**中图分类号** Q2-33, R372**DOI:** 10.16476/j.pibb.2019.0186

细胞培养技术始于1885年Roux尝试的动物组织离体培养, 随后Harrison(1907年)和Carrel(1912年)整理并完善了动物细胞培养技术, 时至今日, 细胞培养技术在现代医学和生物科学研究中发挥着至关重要的作用^[1]. 细胞培养过程是一个严格的无菌操作过程, 虽然目前国内外大多数实验室都建有标准化的细胞培养室来避免微生物及其他有害因素的影响, 以期满足无菌化细胞培养的要求, 但细胞培养过程中的污染问题还是经常发生, 并给研究人员带来极大困扰.

细胞培养中常见的污染类型有细菌污染、真菌污染和支原体污染等^[2]. 细菌在普通倒置显微镜下呈黑色细沙状. 细菌污染细胞后, 细胞培养基会浑浊变黄, 细胞增殖受到抑制^[3]. 真菌在普通倒置显微镜下呈丝状, 有些真菌在生长初期很像细胞碎片, 呈珊瑚状, 随后会长出黑色细长丝状物. 真菌

污染细胞后, 细胞培养基清亮, 无颜色变化, 细胞增殖受到抑制^[4]. 支原体是牛血清中常见的微生物之一, 可通过0.22 μm的滤膜, 普通倒置显微镜下难以看清形态结构, 易被忽视. 支原体污染细胞后, 细胞培养基会变浑浊, 细胞增殖受到抑制, 并且细胞容易脱落^[5].

除了上述几种成分明确的细胞污染之外, 细胞培养过程中还存在一种很常见, 成分却不明确, 争议较大的污染类型: 俗称“黑胶虫”污染, 国外称

* 国家自然科学基金面上项目(81872295)、广东省自然科学基金(2018A030313819)、广东省恶性肿瘤表观遗传与基因调控重点实验室开放基金(2017B030314026).

** 通讯联系人.

郭雅彬. Tel: 13922465749, E-mail: guoyb9@sysu.edu.cn

马广伟. Tel: 18800468083, E-mail: maguangwei77@163.com

收稿日期: 2019-08-09, 接受日期: 2019-12-03

之为“纳米细菌”污染。“黑胶虫”在普通倒置显微镜的低倍镜下通常为黑色点状或碎片状；在高倍镜下，这些黑色颗粒在原地进行“布朗运动”，细胞培养基并不浑浊。一般情况下，细胞数量与“黑胶虫”数量呈负相关，即细胞越少，“黑胶虫”越多；细胞越多，“黑胶虫”越少。有研究人员认为“黑胶虫”属于变形杆菌 a-2 亚群^[6]，存在于胎牛血清中，直径为 80~500 nm^[7]，并可穿过 0.22 μm 的滤膜^[8]；但又有研究称上述报道的“黑胶虫”并非生物，而是一种碳酸钙纳米粒子^[9]。此外，还有文献报道“黑胶虫”为硅复合物，也被称为“硅小体”，其主要来源于细胞培养基对玻璃器皿的侵蚀^[10]。然而，现在细胞培养主要使用一次性塑料器皿，受到“黑胶虫”污染的情况仍时有发生。由于“黑胶虫”的本质不明，人们不知道如何防治，以致该污染长期给研究人员在细胞培养过程中带来困扰和损失。因此，对“黑胶虫”进行鉴定并寻找防治办法是细胞培养中亟待解决的问题。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肾上皮细胞系 (293T) 由本课题组保存，利用 DMEM 高糖完全培养基（含 10% FBS，1% 青霉素-链霉素双抗）在 37℃、5% CO₂ 条件下培养，每 2 d 更换 1 次培养基。

1.2 “黑胶虫”的收集及形态学观察

将一瓶受“黑胶虫”污染的 293T 细胞利用胰酶消化并收集到 15 ml 离心管中，500 r/min 离心 5 min，收集上清于干净的细胞培养瓶中，此时 293T 细胞存留在 15 ml 离心管底部，“黑胶虫”存在于细胞培养瓶中。应用倒置显微镜和透射电镜对“黑胶虫”的形态进行观察，并在激光共聚焦扫描显微镜的高倍镜下拍摄“黑胶虫”的运动轨迹。

1.3 “黑胶虫”的种属鉴定

收集 1.2 节中含有“黑胶虫”的细胞培养基于 2 ml 离心管中，14 000 r/min 离心 10 min 将“黑胶虫”沉淀于管底部，利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）提取基因组 DNA。以细菌 16 S rDNA 通用引物（27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACT-3'）进行 PCR 扩增，反应条件：94℃预变性 5 min；94℃变性 30 s，

55℃退火 30 s，72℃延伸 50 s；72℃终延伸 10 min。同时以大肠杆菌 DH5α 的基因组作为阳性对照、以双蒸水作为阴性对照进行 PCR 扩增。PCR 产物经 120 V 电压、2% 琼脂糖凝胶电泳 20 min，紫外灯下切割含有目的片段的胶块。利用凝胶回收试剂盒（生工生物工程(上海)股份有限公司）进行 DNA 片段回收，进行 Sanger 测序（金唯智公司(江苏)），将测序结果在 NCBI 数据库中进行 Blast，确定种属。同时，利用法国生物梅里埃公司 VITEK-2 微生物鉴定系统鉴定“黑胶虫”种属。

1.4 系统发育树的构建

将菌株的 16 S rDNA 测序结果与 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>) 中的已知序列进行比对，查找相似性最高的菌种，选取同源性较高的序列。利用 MEGA7.0 软件以邻近连接法 (Neighbour-joining, NJ)、最大似然法 (Maximum-likelihood, ML)、最大简约法 (Maximum-parsimony, MP) 构建系统发育树，最后对所生成的进化树运用 Bootstrap 进行 1 000 次检验，以鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas adhaesiva* DSM 7418^T 为外群^[11]。

1.5 抗生素敏感试验

分别吸取“黑胶虫”菌液 10 μl 接种到含不同常规抗生素的 2 ml LB 培养基中，37℃振荡培养 48 h 后进行吸光度值 (A_{600}) 测定。各抗生素终浓度如下：氨苄青霉素 (ampicillin, AMP, β-内酰胺类) 50 mg/L；嘌呤霉素 (puromycin, PURO) 2 mg/L；氯霉素 (chloramphenicol, CHL, 氯霉素类) 25 mg/L；红霉素 (erythromycin, ERY, 大环内酯类) 200 mg/L；四环素 (tetracycline, TET, 四环素类) 2.5 mg/L；青霉素 (penicillin, PEN, β-内酰胺类)-链霉素 (streptomycin, STR, 氨基糖苷类) 双抗 (100×) 2 μl；庆大霉素 (gentamicin, GEN, 氨基糖苷类)-两性霉素 B (amphotericin B, AMP B, 多烯类) (100×) 2 μl。阴性对照：LB 培养基和无水乙醇均各添加 2 μl。

1.6 细胞结晶紫染色

将背景干净无污染的 293T 细胞接种于 6 孔板中 (1.0×10⁶/孔)，每列细胞中分别添加不同种类的抗生素（对照组为终浓度 0.1% 的无水乙醇），每行细胞中分别接种“黑胶虫”菌液 10 μl（对照组添

加 10 μL 无抗性的 LB 培养基), 培养 48 h 后, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 清洗细胞 2 次, 向每孔细胞中加入 1 ml 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的甲醇, 冰上孵育 10 min. 弃去甲醇, 室温干燥, 沿孔壁逐滴加入 1% 结晶紫染液, 直至细胞表面被完全覆盖, 室温孵育 10 min. 吸去结晶紫染液, 并用蒸馏水多次冲洗至染液不再流出, 拍照留图.

1.7 统计分析

数据以平均值 $\pm$ 标准差的格式显示, 利用 Student *T* 检验进行统计学分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义.

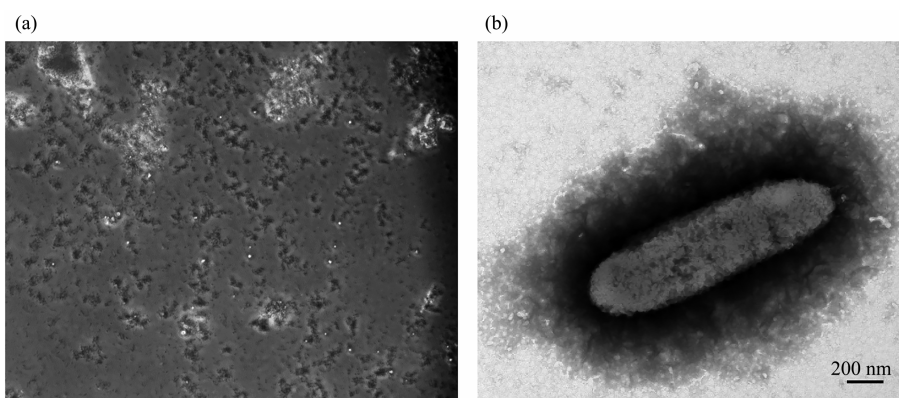


Fig. 1 Morphological observation of “black granules”

(a) The observation was performed using 40 $\times$ objective and 10 $\times$ eyepiece under inverted microscope; (b) The observation was performed using a transmission electron microscope.

2.2 “黑胶虫”的种属鉴定

我们以“黑胶虫”基因组为模板, 利用细菌 16 S rDNA 通用引物 (27F 和 1492R) 进行 PCR, 琼脂糖凝胶电泳显示出一条清晰、单一条带, 位于 1 000 ~ 2 000 bp 之间, Sanger 测序结果显示该片段长度为 1 457 bp. 将测序结果在 NCBI 数据库中进行 Blast, 发现“黑胶虫”与缺陷短波单胞菌 (*Brevundimonas diminuta* ATCC 11568, Sequence ID: NR_040805.1) 有 98% 的同源性. 根据 16 S rDNA 序列 identity 值 $> 98.7\%$ 判定为同一个种, 介于 94.5%~98.7% 之间的判定为同一个属不同种的原则^[12], 我们推测“黑胶虫”可能是短波单胞菌属的新菌株. 同时, VITEK-2 微生物鉴定系统结果显示, 本实验室分离获得的“黑胶虫”为单一菌株, 属于短波单胞菌属, 相似性为 99% (附件图 S1).

2 结 果

2.1 “黑胶虫”的形态学观察

我们将离心收集的“黑胶虫”装于细胞培养瓶中, 并置于倒置显微镜下观察“黑胶虫”的形态, 在 40 倍物镜 (10 倍目镜) 下观察到培养瓶底部布满了呈点状或片状的黑色颗粒 (图 1a), 经透射电镜展示, “黑胶虫”的形态为杆状, 长为 1 300~1 600 nm, 宽为 400~500 nm (图 1b), 在激光共聚焦扫描显微镜的 400 倍镜下拍摄到黑色颗粒在原地进行“布朗运动” (附件视频 S1).

为了进一步确定“黑胶虫”的分类学地位, 我们将其与 GenBank 和 EzBioCloud 数据库中检索的相关分类群进行比较和分析, 该菌株与 *Brevundimonas diminuta* 的相似性为 97.8%, 与 *Brevundimonas faecalis* 的相似性为 98.1%, 初步判定该菌株为短波单胞菌新种. 按照国际微生物命名规则, 我们将其命名为 *Brevundimonas medium*, 编号为 GYBL3, 并利用 MEGA7.0 软件分别以邻近连接法 (neighbour-joining, NJ, 图 2)、最大似然法 (maximum-likelihood, ML, 附件图 S2)、最大简约法 (maximum-parsimony, MP, 附件图 S3) 构建了 *Brevundimonas medium* 与短波单胞菌属的系统发育树, 从邻接法构建的系统发育树中可以看出 *Brevundimonas medium* 与 *Brevundimonas diminuta* 和 *Brevundimonas terrae* 的亲缘关系最近 (图 2).

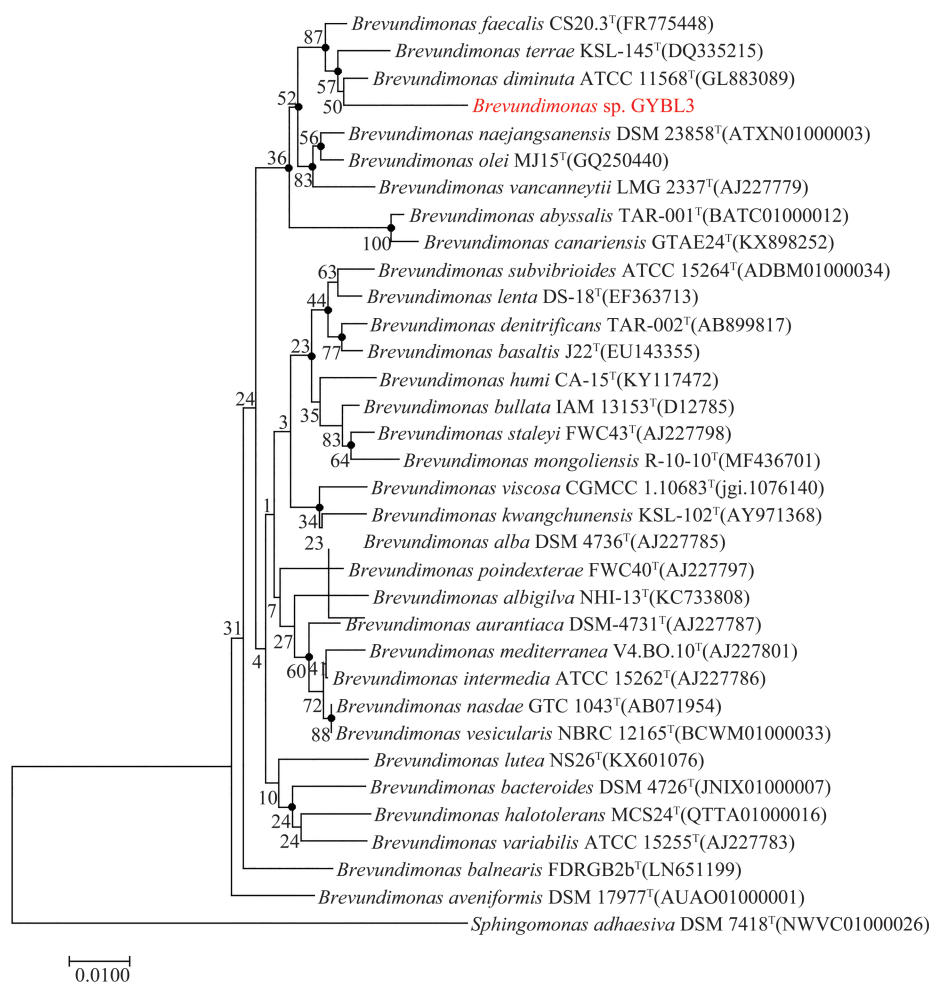


Fig. 2 Neighbour-joining phylogenetic tree of *Brevundimonas* sp. GYBL3

Neighbour-joining phylogenetic tree, reconstructed based on a comparative analysis of 16 S rDNA gene sequences, showing the phylogenetic position of *Brevundimonas medium* and the type strains of related bacteria. The strain in red was isolated from our laboratory. Filled circles at nodes indicate generic branches that were also recovered using the maximum-likelihood and maximum-parsimony algorithms. Bar: 0.0100 substitutions per nucleotide position.

2.3 “黑胶虫”敏感的抗生素筛选

为了筛选得到可抑制“黑胶虫”增殖的抗生素及其可用于细胞培养的工作浓度，我们首先将“黑胶虫”接种到含不同抗生素的LB培养基中，37℃振荡培养48 h后，除含氯霉素、红霉素和四环素的LB培养基未浑浊之外，其余处理组LB培养基均变浑浊。我们对各实验组菌液进行 A_{600} 值测定，结果显示：含氯霉素、红霉素或四环素的LB培养基的 A_{600} 均显著小于其他处理组（图3， $P < 0.05$ ）。上述结果表明：“黑胶虫”对氯霉素（25 mg/L）、红霉素（200 mg/L）或四环素（2.5 mg/L）敏感，对其他抗生素均不敏感。

为了进一步确定“黑胶虫”敏感的抗生素浓度能否应用于细胞培养，我们将无污染的293T细胞

接种于6孔板（ 1.0×10^6 /孔），每孔细胞中分别添加不同的抗生素，并接种“黑胶虫”菌液10 μ l（对照组添加10 μ l无抗性的LB培养基），培养48 h后利用结晶紫染色观察细胞增殖情况。结果显示：当培养基中抗生素为青霉素-链霉素双抗（100 $\times$ ）、庆大霉素-两性霉素B（100 $\times$ ）或无水乙醇时，与对照组相比，“黑胶虫”均能抑制293T细胞增殖（图4）；当培养基中抗生素为氯霉素（浓度25 mg/L）、红霉素（浓度200 mg/L）或者四环素（浓度2.5 mg/L）时，与对照组相比，“黑胶虫”对293T细胞增殖无影响（图4）。综上所述：低浓度的氯霉素、红霉素或者四环素可降低“黑胶虫”对细胞增殖的抑制作用。

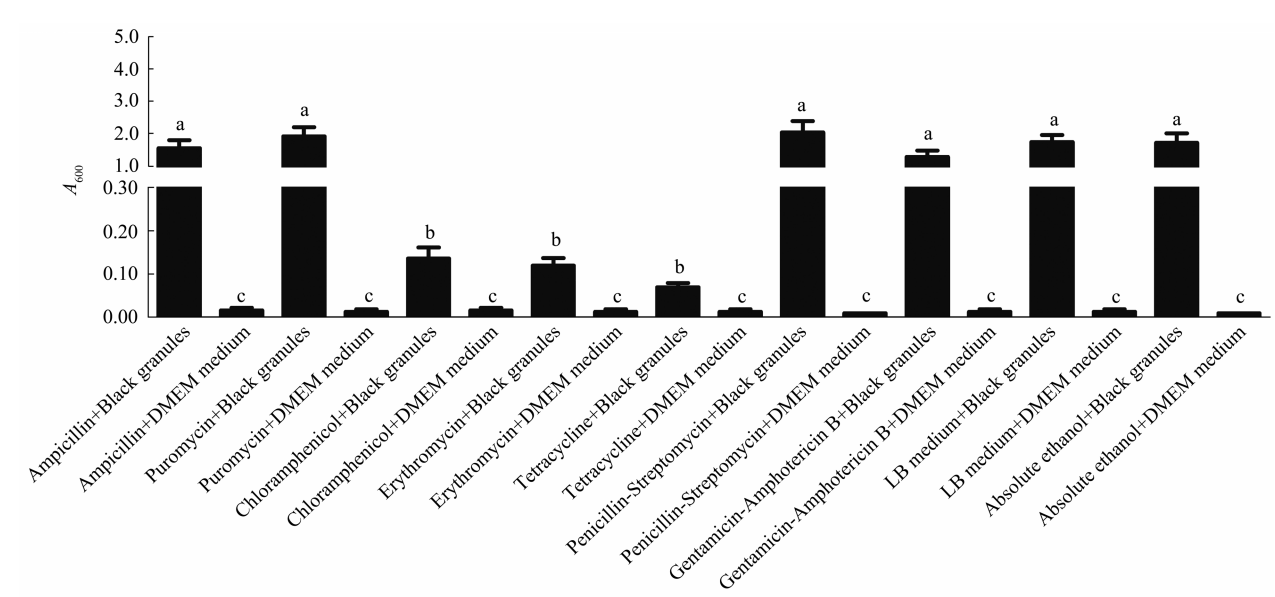


Fig. 3 Antibiotic susceptibility test of “black granules”

In each treatment group, 10 μl of bacterial suspension was added to 2 ml of fresh LB medium, and the control group was added with DMEM medium. The final concentration of each antibiotic as described below: ampicillin, 50 mg/L; puromycin, 2 mg/L; chloramphenicol, 25 mg/L; erythromycin, 200 mg/L, tetracycline, 2.5 mg/L; penicillin-streptomycin (100×): 2 μl; gentamicin-amphotericin B (100×): 2 μl. The negative control of antibiotics was absolute ethanol (2 μl). The values of A_{600} were detected after 48 h of “black granules” inoculation. Different letters above bars represent a significant difference ($P<0.05$).

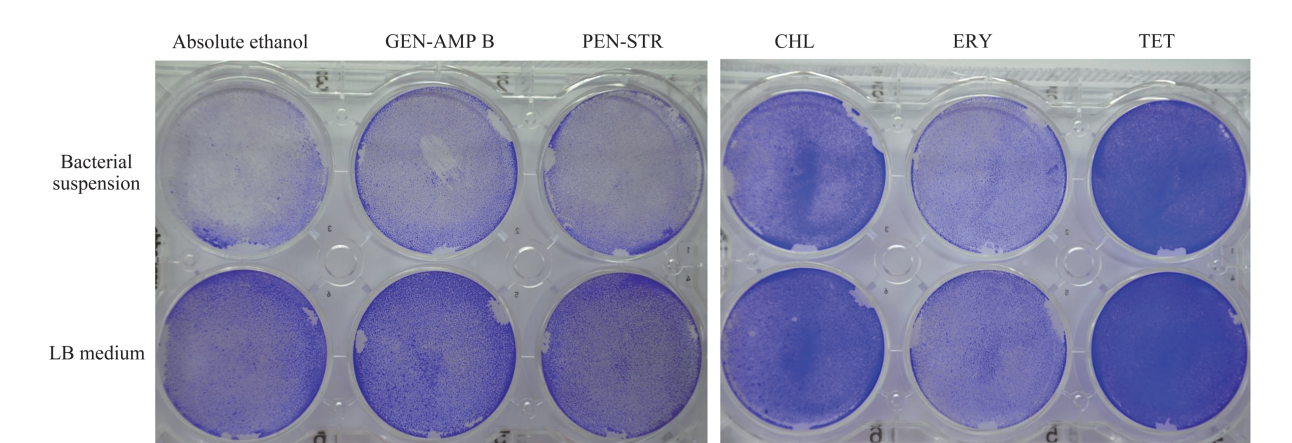


Fig. 4 The impact of “black granules” on cell proliferation

The 293T cells were uniformly seeded into 6-well plates (1.0×10^6 /well). Different antibiotics were added to each column of cells, and 10 μl of bacterial suspension or 10 μl of fresh LB medium were added to each line of cells. After 48 hours, cells were stained with crystal violet staining solution. CHL: chloramphenicol, 25 mg/L; ERY: erythromycin, 200 mg/L; TET: tetracycline, 2.5 mg/L; PEN-STR: penicillin-streptomycin (100×); GEN-AMP B: gentamicin-amphotericin B (100×).

3 讨 论

细胞培养技术是生物医学研究方法中常用的技术, 通过细胞培养既能够研究细胞的信号转导、增殖、分化和凋亡, 又能够用于药物筛选, 以及生产

单抗、细胞因子等生物制品. 细胞状态的好坏受到多重因素影响, 其中无菌、无毒是细胞体外培养的首要条件. “黑胶虫”污染是一个国内实验室广泛存在和影响巨大的问题, 但关于“黑胶虫”的本质一直停留在口头传说与猜测中, 这显然对于问题的

解决没有任何实际帮助. 本研究中, 我们运用科学研究的思路与方法, 寻找污染源头, 以期对“黑胶虫”污染起到切实的防范与救治作用.

本研究鉴定出的“黑胶虫”为短波单胞菌属的新种, 该类菌属的菌种均为需氧非发酵革兰氏阴性杆菌, 在环境中普遍存在^[13]. 短波单胞菌不仅是环境污染物, 而且具有致病性, 其中 *Brevundimonas vesicularis* 和 *Brevundimonas diminuta* 是短波单胞菌属最常见的两种感染致病菌, 能够感染人类组织和器官而致病, 如菌血症、肺炎和心内膜炎等^[14]. 因此我们在生活和工作中应尽量避免与该类菌直接接触, 一旦感染应及时就医, 以防病情加重. 我们的研究不但有助于解决细胞培养实验中的问题, 同时也为操作人员的安全防护提供了有用的信息.

Brevundimonas diminuta 常用于除菌过滤器完整性微生物截留试验, 也可用于无菌产品容器密封完整性微生物挑战试验, 其粒径会随着培养条件的改变而改变, 过滤除菌不当时该菌可能穿过滤膜, 造成培养物污染^[15]. 本研究所鉴定的“黑胶虫”为其同属, 因此可能具备该类菌的特性, 在细胞培养过程中穿过 0.22 μm 滤膜, 导致细胞污染; 此外, 也可能是由于培养环境的恶化或操作不当而引入“黑胶虫”. 为查明该菌的污染源头, 我们将在今后的研究中对细胞培养基、血清、培养箱环境等进行全面的检测.

国外也有类似“黑胶虫”污染的报道, 一般称为纳米细菌污染^[6-8], 但关于纳米细菌究竟是何种生物还未有一个统一的说法. 鉴于我们研究中所鉴定出的细菌与已有报道中的不同, “黑胶虫”/纳米细菌污染应该是一类污染的总称, 在全球普遍存在, 其特点为: 在低倍镜下, “黑胶虫”/纳米细菌呈黑色颗粒状或片状; 在高倍镜下, 黑色颗粒在原地进行“布朗运动”, 并且“黑胶虫”/纳米细菌数量与细胞数量呈负相关. 本研究鉴定出了一种细胞培养微生物污染源的种属, 并利用抗生素敏感试验筛选出3种可抑制其增殖的抗生素, 有望帮助一些实验室解决污染问题, 并为不明污染物的鉴定和控制提供了新的科研思路及方法.

本研究还存在一定的局限性, 即只考虑了单一抗生素的抑菌/杀菌效果, 未考虑抗生素的联合应用. 根据抗生素的作用方式不同可将抗生素分为繁殖期杀菌剂(破坏细菌细胞壁)、静止期杀菌剂(诱导细菌合成错误蛋白质)、速效抑菌剂(迅速抑

制细菌蛋白质的合成)和慢效抑菌剂(抑制细菌叶酸合成). 本研究筛选出的红霉素、氯霉素和四环素均属于速效抑菌剂, 它们通过干扰细菌核糖体30 S小亚基和50 S大亚基的功能, 进而影响核糖体翻译多肽链从而抑制细菌增殖^[16-17]. 鉴于不同实验室所污染的“黑胶虫”/纳米细菌可能不同, 我们后续会对抗生素联合应用的合理搭配和工作浓度进行更为深入细致的研究, 使其具有更普遍的实用性, 以期能够切实解决生物医学研究工作者在细胞培养过程中遇到的“黑胶虫”/纳米细菌污染问题, 为细胞培养技术的发展提供动力.

附件 视频 S1, 图 S1~S3 见本文网络版 (<http://www.cnki.net> 或 <http://www.pibb.ac.cn>).

参 考 文 献

- [1] 曾今诚, 徐军发, 周克元. 细胞培养及常见污染防治技术进展. 国际检验医学杂志, 2012, **33**(20): 2522-2524
Zeng J C, Xu J F, Zhou K Y. International Journal of Laboratory Medicine, 2012, **33**(20): 2522-2524
- [2] 曾卫东, 董青. 动物细胞培养中微生物污染的检测. 浙江畜牧兽医, 2003, **28**(2): 12
Zeng W D, Dong Q. Zhejiang Journal Animal Science and Veterinary Medicine, 2003, **28**(2): 12
- [3] 江千里, 王健民, 江汕, 等. 西司他丁钠+亚胺培南消除细胞培养中细菌污染的研究. 第二军医大学学报, 2004, **25**(1): 114-115
Jiang Q L, Wang J M, Jiang S, et al. Academic Journal of Second Military Medical University, 2004, **25**(1): 114-115
- [4] 邵荣标, 钱勤虎, 吴巨飞, 等. 细胞培养法真菌污染控制初探. 南通大学学报: 医学版, 2002, **22**(3): 278
Shao R B, Qian J H, Wu C F, et al. Journal of Nantong University: Medical Sciences, 2002, **22**(3): 278
- [5] 赵俊, 王兴满, 胡勇, 等. 动物细胞培养物中支原体污染的检测. 安徽农业科学, 2010, **38**(03): 1151-1153
Zhao J, Wang X M, Hu Y, et al. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, **38**(3): 1151-1153
- [6] Kajander E O, Ciftcioglu N. Nanobacteria: an alternative mechanism for pathogenic intra- and extracellular calcification and stone formation. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95**(14): 8274-8279
- [7] Ciftcioglu N, Kajander E O. Interaction of nanobacteria with cultured mammalian cells. Pathophysiology, 1998, **4**(4): 259-270
- [8] Hjelle J T, Millerhjelle M A, Poxton I R, et al. Endotoxin and nanobacteria in polycystic kidney disease. Kidney International, 2000, **57**(6): 2360-2374
- [9] Martel J, Young J D. Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, **105**(14): 5549-5554
- [10] 韩雪梅, 王永春, 吴翠娇, 等. 对细胞培养中一种黑色运动颗粒

- 性质的研究. 中国细胞生物学学报, 1990(2): 73-76
- Han X M, Wang Y C, Wu C J, *et al.* Chinese Journal of Cell Biology, 1990(2): 73-76
- [11] Yabuuchi E, Yano I, Oyaizu H, *et al.* Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. Microbiology and Immunology, 1990, 34(2): 99-119
- [12] Hiergeist A, Gläsner J, Reischl U, *et al.* Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. ILAR Journal, 2015, 56(2): 228-240
- [13] Lee M R, Huang Y T, Liao C H, *et al.* Bacteremia caused by *Brevundimonas* species at a tertiary care hospital in Taiwan, 2000-2010. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(10): 1185-1191
- [14] Gupta P K, Appannanavar S B, Kaur H, *et al.* Hospital acquired urinary tract infection by multidrug-resistant *Brevundimonas vesicularis*. Ind J Pathol Microbiol, 2014, 57(3): 486-488
- [15] Lee S H, Lee S S, Kim C W. Changes in the cell size of *Brevundimonas diminuta* using different growth agitation rates. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology / PDA, 2002, 56(2): 99-108
- [16] Champney W S. The Other Target for Ribosomal antibiotics: inhibition of bacterial ribosomal subunit formation. Infectious Disorders - Drug Targets (Formerly Current Drug Targets - Infectious), 2006, 6(4): 377-390
- [17] 胡亚美, 江载芳. 诸福棠实用儿科学. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 240-249
- Hu Y M, Jiang Z F. Zhu Futang Practical Paediatrics. Beijing: People Health Press, 2002: 240-249

Detection and Treatment of “Black Granules” Contamination in Cell Culture*

ZHOU Yi-Ting^{1,2)}, GAO Zeng-Hong^{1,2)}, YANG Jia-Wen^{1,2)},
WANG Jin^{1,2)}, GUO Ya-Bin^{1,2)}**, MA Guang-Wei^{1,2)}**

⁽¹⁾Guangdong Provincial Key Laboratory of Malignant Tumor Epigenetics and Gene Regulation, Guangzhou 510000, China;

⁽²⁾Medical Research Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510000, China)

Abstract Many domestic cell culture laboratories are plagued by "black granules" contamination, which are commonly referred to as "nanobacteria" contamination in foreign countries, but the species of "black granules" has not been determined. "Black granules" were isolated from DMEM medium, and 16 S rDNA sequencing and VITEK-2 microbial identification system were used for the classification and identification of "black granules". Antibiotic susceptibility assay and crystal violet staining technique were used to screen the antibiotics sensitive to "black granules" and their suitable concentrations for cell culture. We observed that "black granules" were spotted or flaky with an inverted microscope. The "black granules" was rod-shaped, with a length of 1 300–1 600 nm and a width of 400–500 nm under the transmission electron microscope, and "Brownian motion" was performed in situ under confocal laser scanning microscope. The results of 16 S rDNA sequencing and VITEK-2 microbial identification system showed that "black granules" was a new strain of *Brevundimonas*, and its sequences were 97.8% similar to *Brevundimonas diminuta* as well as 98.1% similar to *Brevundimonas faecalis*, respectively. Antibiotic susceptibility assay showed that "black granules" were sensitive to antibiotics chloramphenicol (25 mg/L), erythromycin (200 mg/L) and tetracycline (2.5 mg/L), but resistant to ampicillin (50 mg/L), puromycin (2 mg/L), penicillin-streptomycin (100×) or gentamicin-amphotericin B (100×). Crystal violet staining showed that the proliferation of "black granules" was inhibited by the chloramphenicol (25 mg/L), erythromycin (200 mg/L) or tetracycline (2.5 mg/L) in the DMEM medium, and the inhibition of "black granules" for cell proliferation were reduced. In summary, the "black granules" isolated and identified in our study was a new strain of *Brevundimonas*, and the inhibition of "black granules" for cell proliferation could be reduced by low concentration of chloramphenicol, erythromycin or tetracycline. Due to the limitations of this study, there may be other possibilities for the species of "black granules". This study provides new research ideas and methods for species identification of "black granules" or nanobacteria and sterile culture of cells.

Key words cell culture, contamination, "black granules", nanobacteria, antibiotics

DOI: 10.16476/j.pibb.2019.0186

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81872295), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2018A030313819), and Guangdong Province Key Laboratory of Malignant Tumor Epigenetics and Gene Regulation (2017B030314026).

** Corresponding author.

GUO Ya-Bin. Tel: 13922465749, E-mail: guoyb9@sysu.edu.cn

MA Guang-Wei. Tel: 18800468083, E-mail: maguangwei77@163.com

Received: August 9, 2019 Accepted: December 3, 2019