

脉冲高电压对副溶血性弧菌病原性的影响

苏泽红¹, 练高建², 余美华¹, 中川亮佑⁴, 高桥章⁵, 尹卫东^{1,3}

(1. 南华大学药学与生命科学院生物技术系, 湖南衡阳 421001) (2. 南华大学实验动物学部, 湖南衡阳 421001)
(3. 南华大学生命科学研究中心, 心研所, 湖南衡阳 421001) (4. 德岛大学工学部电气系, 日本德岛 770-8501)
(5. 德岛大学医学部营养学系, 日本德岛 770-8503)

摘要: 本实验运用布鲁姆林式脉冲成形网络系统对副溶血性弧菌悬液进行处理, 发现该系统对副溶血性弧菌有较强的灭菌效果, 同时细胞毒性有所下降, 且随电压升高而降低; 而三型分泌系统相关的基因表达随电压升高而增强, 表明脉冲高压电场对细菌病原性有一定的影响, 可为液体食品灭菌、生物制品以及疫苗制备过程中抗原灭活提供一定的理论依据。

关键词: 布鲁姆林式脉冲成形网络系统; 脉冲高电压; 副溶血性弧菌; III型分泌系统

文章编号: 1673-9078(2012)7-743-745

Effect of Pulse Electric Fields on the Pathogenic of *Vibrio parahaemolyticus*

SU Ze-hong¹, LIAN Gao-jian², SHE Mei-hua¹, NAGAKAWA Ryosuke⁴, TAKAHASHI Akira⁵, YIN Wei-dong^{1,2}

(1. Department of Biotechnology; School of Pharmacology and Life Sciences and Technology, University of South China; Hengyang; Hunan 421001; China) (2. Department of Experimental Zoology, University of South China; Hengyang; Hunan 421001; China) (3. Key Laboratory for Atherosclerosis of Hunan Province, Institute of Cardiovascular Research, Life Science Research Center, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, People's Republic of China)
(4. Department of preventive and environment nutrition, Tokushima University, Tokushima, 770-8501, Japan)
(5. Department of electric engineering, Tokushima University, Tokushima, 770-8503, Japan)

Abstract: A Blumlein type pulse forming network system was developed for treating *Vibrio parahaemolyticus* suspension solution. The results showed a high disinfection ability of this high voltage pulse electric fields on *Vibrio parahaemolyticus*. Meanwhile, the cytotoxicity of the bacteria was reduced after the bacteria were treated by this system. The expression level of three type secretion system-related genes increased with the increase of voltage, indicating that high-voltage pulse electric fields affected the pathogenic of bacteria. This research could be a theoretical base for liquid food disinfection, bioproducts and vaccine inactivation.

Key words: Blumlein type pulse forming network system; high voltage pulse electric field; *Vibrio parahaemolyticus*; type three secretion system

液体制剂的灭菌要求要高于其他物质的灭菌, 因为在保证食品新鲜的同时还要保持它们原有的天然风味和营养结构。传统的高温灭菌法, 在灭菌的同时, 会破坏食品中的营养成分, 从而导致液体食品营养价值低; 而紫外线照射杀菌又受穿透力影响, 导致其杀菌能力下降; 臭氧灭菌则受限于臭氧生产成本高^[1-7]。

副溶血性弧菌是革兰氏阴性致病菌, 主要寄生在海产品中。近年来随着海产品加工形式的增多, 生食海产品也趋于潮流化, 面临副溶血性弧菌污染的威胁

也越来越多^[8]。因此, 亟需开发一种既能有效杀灭副溶血性弧菌, 又能保持海产品原有风味的灭菌方法。

近年来, 由于脉冲高电压液体灭菌具有常温下灭菌效果好, 尤其是对于革兰氏阴性菌, 有较好的杀菌效果^[9]; 既在瞬间杀死了有害细菌, 又能保持食品功能成分的生理活性; 环保, 且不产生有毒化学物质的残留; 设备简单, 投资少, 耗能低等优点, 脉冲高电压技术广泛应用于各个领域^[7,8,10]。而将脉冲高压技术用于液体海产品(如以海产品为原料制作的酒、液体胶囊、液体调味品、液体保健品如鱼油等)的灭菌, 尤其是对病原菌的致病性及病原性的影响尚未见报道。

本实验采用日本德岛大学电气系研制的布鲁姆林

收稿日期: 2012-04-12

基金项目: 衡阳市科技局 (2011KJ19)

作者简介: 苏泽红 (1976-), 女, 博士, 讲师

通讯作者: 尹卫东, 教授

式脉冲成形网络系统 (Blumlein type pulse forming network system, B-PFN), 研究了电场强度、脉冲次数变化对副溶血性弧菌 RIMD2210633 存活率及其病原性的主要决定因素-热稳定直接相关蛋白(TDH)和III型分泌系统的影响, 为高压脉冲技术应用于海产品的灭菌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌悬液的制备

副溶血性弧菌 RIMD2210633 由日本德岛大学营养学部提供。取冻存的菌种, 于 37 °C 下, 在含 3% NaCl 的 LB 培养液中振荡培养至对数生长期后, 用 PBS 洗两次, 调 OD600 为 1.0, 使菌液浓度为 10⁹ CFU/mL 左右, 备用。

1.1.2 布鲁姆林式脉冲形成网络电场

脉冲放电冲击波杀菌流程见图 1。当间隙开关闭合时, 电容和充电电压随之变化。当电容为 600 pF, 电感为 1.08 μH 时, 该系统产生 100 ns 的脉冲波, 此时系统电阻为 84.8 Ω, 脉冲电压和脉冲电流的振幅分别是 4.5 kV 和 480 A。电场对反应室内菌悬液的振幅

约为 9 kV/cm。反应室的电阻约为 12 Ω。

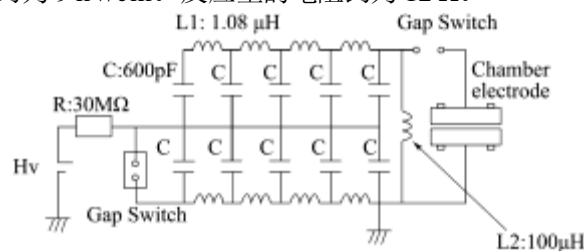


图 1 高电压脉冲电场电路图

Fig.1 Circuit diagram of high voltage pulse electric fields

1.2 实验方法

取备好的菌悬液 2 mL 装入反应室内, 脉冲次数为 1000 次, 分别在 6 kV 和 12 kV 条件处理菌液。处理结束后, 收集菌液, 将一部分稀释至一定浓度后, 取 100 μL 菌液涂布到含 3% NaCl 的 LB 培养基上, 于 37 °C 下培养 16~18 h, 观察菌落, 并计数。

另一部分菌液离心, 抽提 RNA 后, 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板用实时定量 PCR 的方法检测 III 型分泌系统有关的三种主要基因 (*tdh*、*VP1680*、*VP1699*) 的表达水平。以 16S RNA 为内对照, 计算三种基因表达水平的相对变化量。

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primer of real-time quantitative PCR

Gene	Forward	Reverse
<i>tdh</i>	GTCGACAATTCACGACGAATCGGAG	GAATTCATATCGGTA CTTTCATAAA
<i>VP1680</i>	CACACTTGGTATGGCGACAG	TGAGTTGGTCTTGCACTTCG
<i>VP1699</i>	GGTCAATTACGAGTTCAAAC	GCAGTAATTGGCTTACTAGC

2 结果与讨论

2.1 高压脉冲电场对副溶血性弧菌存活率的影响

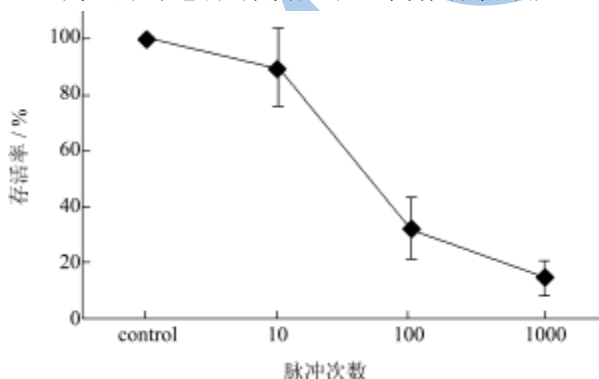


图 2 6kV 电场下不同脉冲次数的对副溶血性弧菌存活率的影响

Fig.2 Effect of pulse times of high-voltage pulse electric fields (6 kV) on livability of *Vibrio parahaemolyticus*

分别采用高压脉冲电场电压为 6 kV, 12 kV, 脉冲次数 10 次、100 次、1000 次, 不同场强对副溶血性弧菌进行处理。未处理样品为对照 (control), 由图 2

和图 3 可以看出, 在 6 kV 和 12 kV 下, 脉冲 10 次后, 细菌存活率分别为 90.7% 和 79.5%, 而脉冲 1000 次后, 细菌存活率仅为 14.2% 和 5.58%。数据表明, 随着电压升高、脉冲次数增多, 灭菌能力明显增强。

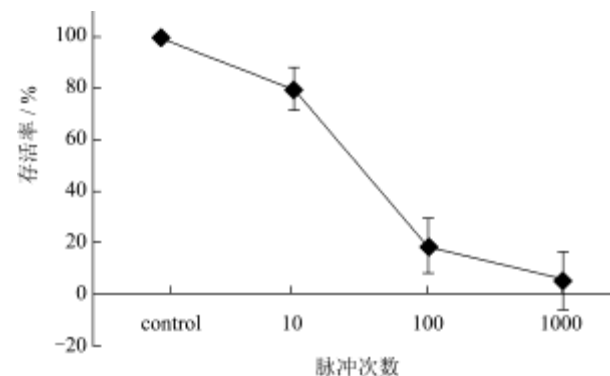


图 3 12kV 电场下不同脉冲次数的对副溶血性弧菌存活率的影响

Fig.3 Effect of pulse times of high-voltage pulse electric fields (12 kV) on livability of *Vibrio parahaemolyticus*

2.2 高压脉冲电场对副溶血性弧菌 III 型分泌系统的影响

副溶血性弧菌为病原菌，它是一种嗜盐性革兰氏阴性菌，进食生的或未煮透的海产品可能导致副溶血性弧菌污染，引起腹泻、头痛、呕吐、恶心、痉挛和低烧等症状。研究认为该菌的致病性和细胞毒性跟其III型分泌系统和热稳定直接相关蛋白(TDH)有关^[11-12]。编码副溶血性弧菌III型分泌系统的效应器的主要基因为 *VP1680*，主要编码阳性调控因子的基因为 *VP1699*。

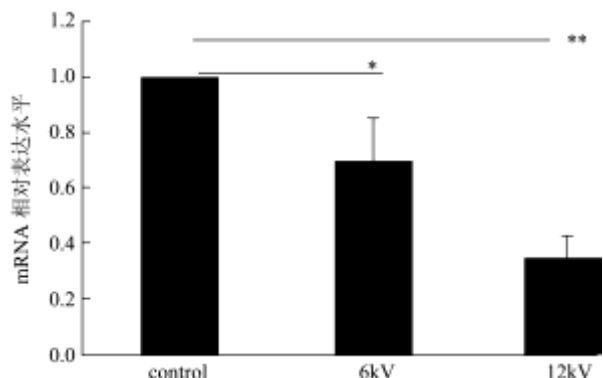


图4 高压脉冲网络系统处理后的副溶血性弧菌热稳定直接相关蛋白基因 (*tdh*) 表达水平的变化

Fig.4 The *tdh* gene expression levels of *Vibrio parahaemolyticus* treated by high-voltage pulse electric fields

注：Control：没有经过脉冲处理的菌液，设定 16S RNA 表达水平为 1；6kV：电压为 6kV，脉冲次数为 1000 条件下处理的菌液；12 kV：电压为 12 kV，脉冲次数为 1000 条件下处理的菌液。*：p<0.05，**：p<0.01。

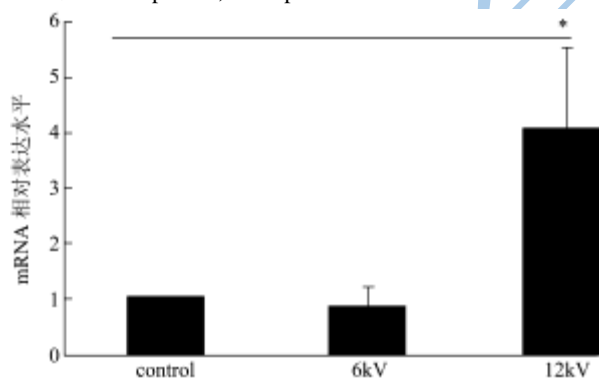


图5 高压脉冲网络系统处理后的副溶血性弧菌III型分泌系统效应器主要基因 *VP1680* 表达水平的变化

Fig.5 The expression levels of *VP1680* gene of *Vibrio parahaemolyticus* treated by high-voltage pulse electric fields

注：Control：没有经过脉冲处理的菌液，设定 16SRNA 表达水平为 1；6kV：电压为 6kV，脉冲次数为 1000 条件下处理的菌液；12 kV：电压为 12 kV，脉冲次数为 1000 条件下处理的菌液。*：p<0.05。

由图4可以看出，热稳定直接相关蛋白 TDH 编码基因 *tdh* 在经过脉冲高电压处理后，其 mRNA 表达水平显著下降 (P<0.05)；且随电压增高，表达水平越

低。12 kV 电压下，*tdh* 表达水平与对照组相比，差异性非常显著 (P<0.01)。提示脉冲高电压电场可以降低副溶血性弧菌的细胞毒性，而且电压越高，其降低该菌细胞毒性的能力越强。

图5显示，在较低电压的脉冲电场 (6 kV) 处理后的副溶血性弧菌，其III型分泌系统效应器主要基因 *VP1680* 的 mRNA 表达水平跟对照组比，略有下降，但跟对照组相比，无显著差异性。而当用较高电压 (12 kV) 处理该菌时，*VP1680* 表达水平比对照组显著升高。表明在只有较高电压的脉冲电场中，*VP1680* 的表达水平才受影响。

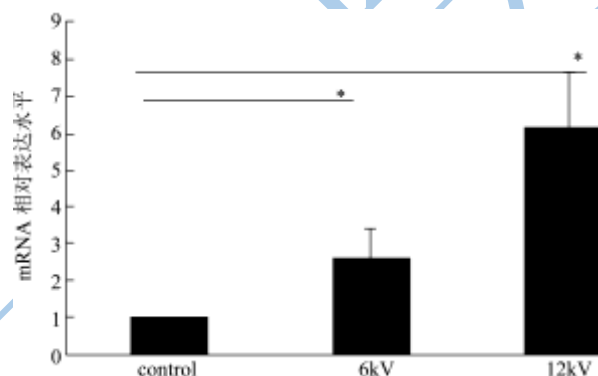


图6 高压脉冲网络系统处理后的副溶血性弧菌III型分泌系统效应器基因 *VP1699* 的表达水平变化

Fig.6 The *VP1699* gene expression levels of *Vibrio parahaemolyticus* treated by high-voltage pulse electric fields

注：Control：没有经过脉冲处理的菌液，设定 16S RNA 表达水平为 1；6kV：电压为 6kV，脉冲次数为 1000 条件下处理的菌液；12 kV：电压为 12 kV，脉冲次数为 1000 条件下处理的菌液。*：p<0.05。

图6表明，副溶血性弧菌III型分泌系统的阳性调控因子 *VP1699* 在脉冲电场处理后，mRNA 表达水平升高，且电压越高，升高幅度越大。在较低电压和较高电压下，与对照组相比，都有显著差异性 (p<0.05)。提示布鲁姆林高压脉冲网络系统能影响副溶血性弧菌的病原性和致病性，可为液体食品、生物制品以及疫苗制备过程中抗原灭活提供一定的理论依据。

3 结论

以上结果表明，高压脉冲网络系统对副溶血性弧菌具有很强的杀菌作用，可实现常温条件下杀菌的目的，且对副溶血性弧菌细胞毒性和病原性有一定的影响，而较高电压 (12 kV) 下，更是能显著降低该菌的细胞毒性和病原性，可为高压脉冲网络系统应用于病原菌的灭菌提高理论依据。

参考文献

- [1] 廖小军,钟葵,王黎明,等.高压脉冲电场对橙汁大肠杆菌和理化性质的影响效果[J].食品科学,2003,24(6):59-61
- [2] 孙静,孔繁东,祖国仁,等.高压脉冲电场对酵母菌和大肠杆菌存活率的影响[J].食品科学,2004,25(2):87-91
- [3] 依成武,吴春笃,徐玮,等.高压脉冲电场冲击波法的液体杀菌实验研究[J].高电压技术,2007,33(2):109-111
- [4] 葛松华.高压脉冲电场技术在液体食品杀菌中的应用[J].物理与工程,2005,15(1):42-44
- [5] 周继章,宫晓炜.脉冲放电杀菌技术及其应用研究进展[J].动物医学进展,2010,31(7):95-98
- [6] 张潮,周田,张志红,等.脉冲高电压灭菌的研究[J].四川大学学报(工程科学版),1998,2(4):71-75
- [7] 吴为民,李树杰,许东卫.脉冲高电压液体灭菌技术的研究[J].高电压技术,1994,20(4):3-7
- [8] Nakano M, Takahashi A, Su Z, et al. Hfq regulates the expression of the thermostable direct hemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *BMC Microbiol*, 2008, 8: 155-163
- [9] 杜存臣,颜惠庚.高压脉冲电场非热杀菌技术研究进展[J].现代食品科技,2005,21(3):151-154
- [10] 尤吉,颜惠庚,杜存臣.高压脉冲电场在食品灭菌方面的研究现状及展望[J].现代食品科技,2006,22(4):290-292
- [11] AM Anpilov, EM Barkhudarov, N Christofi, et al. Pulsed high voltage electric discharge disinfection of microbially contaminated liquids [J]. *Letters in Applied Microbiology*. 2002, 35: 90-94
- [12] Okada N, Matsuda S, Matsuyama J, et al. Presence of genes for type III secretion system 2 in *Vibrio mimicus* strains [J]. *BMC Microbiol*. 2010, 10: 302-311