

副溶血弧菌在玻璃表面生物菌膜的生长特性及超声波法解离作用

吴谦, 邓曦, 马悦, 唐书泽

(暨南大学食品科学与工程系, 广东广州 510632)

摘要: 本文研究了副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 在玻璃表面生物菌膜 (biofilm, BF) 的生长特性, 生长过程中环境因素的影响及超声波对其的解离作用。采用结晶紫染色法观察生物菌膜在玻璃表面的生长形态; 酶标仪在 595 nm 波长处测量不同培养条件下生物菌膜的生物量; 平板菌落计数法衡量超声波对菌膜的解离效果。结果表明: 结晶紫染色法可直观清晰观察副溶血弧菌在玻璃表面形成的生物菌膜, 且随着培养时间的延长, 副溶血弧菌生物菌膜形成的网状结构越来越致密。根据酶标仪测得的生物菌膜生物量的大小可得到在玻璃表面菌膜生长的最佳条件, 当培养基盐度为 3%, 培养时间为 24 h, 培养时转速为 70 r/min 得到的副溶血弧菌生物菌膜已经成熟且菌体个数达到 2.56×10^7 CFU/cm²。用 50 kHz 超声波, 采用间歇式超声波处理方法 (每作用 30 s 间隔 30 s) 作用总时间 4 min 在保持菌体活性的同时能达到最佳解离效果。

关键词: 生物菌膜; 副溶血弧菌; 剪切力; 超声波法

文章编号: 1673-9078(2015)4-181-185

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.4.029

Growth Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* Biofilm on Glass Surfaces and Biofilm Detachment under Ultrasound Treatment

WU Qian, DENG Xi, MA Yue, TANG Shu-ze

(Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The growth characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* biofilms on glass surfaces, the effects of environmental factors during biofilm formation, and biofilm detachment under ultrasound treatment were investigated. The morphology of *V. parahaemolyticus* biofilms on the glass surface was observed by crystal violet staining, biofilm biomass was measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader at 595 nm, and the extent of biofilm detachment was measured by counting colony-forming units (CFU) using the plate count method. *V. parahaemolyticus* biofilms formed on the glass surface, and could be directly observed using crystal violet staining. The reticular structure formed by the *V. parahaemolyticus* biofilm became denser with increasing cultivation time. The optimum parameters for *V. parahaemolyticus* biofilm formation with respect to biomass were determined using the plate reader. For a culture medium salinity of 3%, a rotation speed of 70 r/min, and an incubation time of 24 h, the number of bacteria in the mature *V. parahaemolyticus* biofilm was 2.56×10^7 CFU/cm². Optimal biofilm detachment was obtained under pulsed ultrasound treatment (30-s sonication at intervals of 30 s) applying a frequency at 50 kHz for four minutes, and the viability of bacteria was maintained under these conditions.

Key words: biofilm; *Vibrio parahaemolyticus*; shear stress; ultrasound treatment

副溶血弧菌是导致食物中毒的主要食源性病原菌之一^[1]。在日本、台湾等地由副溶血弧菌引起的食物中毒事件分别占总食源性食物中毒事件的 70%、50%^[2]。在自然环境中副溶血弧菌主要以生物菌膜的形式存在^[3]即菌体被自身所分泌的胞外聚合物

收稿日期: 2014-07-10

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (S2012010008479); 广东省突发公共事件应急技术研究中心专项 ([2011]733)

作者简介: 吴谦 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全

通讯作者: 唐书泽 (1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品安全

(Extracellular polymeric substance, EPS) 包裹聚集而形成生物群落。副溶血弧菌在食品加工、包装、储存等过程中容易粘附在不锈钢、玻璃等非生物表面形成生物菌膜从而增大灭菌难度, 引起食品安全问题^[4]。

副溶血弧菌在玻璃表面形成生物菌膜一般经过粘附、聚集、成熟、分散等过程, 环境因素如盐度、剪切力、培养时间等对其生长影响很大^[5]。移除生物菌膜一般有擦拭、漂洗、涡旋振荡、超声波等方法^[6], 其中擦拭法容易导致解离不完全; 漂洗法、涡旋振荡法所需的时间过长且易造成菌体损伤, 解离过程中造

成的损伤不利于全面的对生物菌膜进行结构与性质研究；超声波法是利用空穴作用产生微小气泡达到从非生物表面解离生物菌膜的效果。超声波因其具有高效、方便等特点已被广泛运用于清洗首饰、医疗器械等^[7]，但利用超声波解离玻璃表面副溶血弧菌生物菌膜且保持其菌体生物活性的研究少有报道。所以探究最佳的超声波作用条件以期获得保持生物活性的副溶血弧菌生物菌膜对进一步研究其特性有重要的意义。

本文的研究目的是探究副溶血弧菌在玻璃表面形成的生物菌膜的生长形态，生长过程中环境因素对其的影响及利用超声波法达到解离生物菌膜且保持其生物活性的效果。为进一步研究副溶血弧菌生物菌膜特性、机理及其灭活提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株与培养基

副溶血弧菌标准菌株 ATCC17802

胰蛋白胨大豆琼脂培养基、蛋白胨大豆肉汤培养基，青岛海博生物技术有限公司

1.2 试剂与仪器设备

结晶紫，天津市科密欧化学试剂开发中心；MK3酶标仪，美国赛默飞世尔；双目型 XSP-2CA 显微镜，上海团结仪器制造有限公司；超声波清洗器 SK3310LHC，上海科导超声仪器有限公司。

1.3 菌种的培养与前处理

将活化的副溶血弧菌接种于 5 mL 含 3% 氯化钠的胰蛋白胨大豆肉汤 (Tryptone soy broth, TSB-3%NaCl) 培养基中，在 37 °C 以 100 r/min 震荡培养 16 h 至生长稳定期 (Stationary phase)^[4]；以 4500 r/min 离心 10 min，弃去上清液，用 1 mL 含 3% 氯化钠的无菌水洗涤两次，重新悬浮于含 3% 氯化钠 pH 为 7.4 的无菌磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffered saline, PBS-3%NaCl) 中，涡旋震荡均匀。

1.4 *V. parahaemolyticus* 生物菌膜的培养与检测

1.4.1 结晶紫染色法观察 *V. parahaemolyticus* 生物菌膜

在 6 孔平底板 (放置了 20×20 mm 的盖玻片) 中加入 200 μL 菌悬液 (OD_{595nm} 值为 0.1, 约 10⁸ CFU/mL)。后加入 5 mL 含 3% 氯化钠的 TSB 培养基，

在 37 °C 以 100 r/min 分别培养 0、12、24、36、48 h，小心取出盖玻片，用 3% NaCl 无菌水洗数次以除去浮游菌；用 200 μL 10% 甲醇固定 10 min，加 200 μL 0.1% 结晶紫染色 5 min，用含 3% NaCl 无菌水洗至无紫色脱出，自然干燥，置显微镜下观察。同时，做空白对照 (不加菌悬液培养)。

1.4.2 培养时间对 *V. parahaemolyticus* 生物菌膜形成的影响

在 6 孔平底板 (放置了 20×20 mm 的盖玻片) 中加入 200 μL 菌悬液 (OD_{595nm} 值为 0.1) 后加入 5 mL 含 3% 氯化钠的 TSB 培养基，在 37 °C 以 100 r/min 分别培养 0、12、24、36、48 h 到 120 h。按照 Djordjevic 等^[8]的方法进行改进，操作如下：小心取出盖玻片，用 3% NaCl 无菌水洗数次以除去浮游菌；盖玻片经 200 μL 10% 甲醇固定 10 min，200 μL 0.1% 结晶紫染色 5 min，用无菌水洗至无紫色脱出，60 °C 干燥 30 min 后，加 1 mL 33% 乙酸每片浸没盖玻片，小心震荡使结晶紫溶解，用酶标仪于波长 595 nm 处测其光密度值。同时，做空白对照。试验重复三次，取平均值。用 OD_{595nm} 值反映生物量的大小。

1.4.3 培养基盐度与培养方式对 *V. parahaemolyticus* 生物菌膜形成的影响

在 6 孔板里 (放置了 20×20 mm 的盖玻片) 加 200 μL 菌悬液 (OD_{595nm} 值为 0.1) 后分别加盐度为 0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0%、7.0% 的 TSB 培养基 5 mL，于摇床内 37 °C 震荡培养 (转速 (r/min) 分别为 0、50、70、100、130) 24 h 后，操作如 1.4.2，用酶标仪测量 OD_{595nm} 值来反应生物量的多少。试验重复三次，取平均值。

1.5 超声波法对玻璃表面 *V. parahaemolyticus*

生物菌膜的解离作用

1.5.1 超声波法作用方式对 *V. parahaemolyticus* 生物菌膜解离作用的影响

根据 1.4.2 和 1.4.3 所得的最佳培养条件在玻璃表面培养副溶血弧菌生物菌膜。取出后用含 3% 氯化钠的生理盐水小心冲洗 3 次以洗去表面的浮游菌，在无菌环境中干燥后投入到有 10 mL 无菌磷酸盐缓冲液的无菌试管中，密封。在超声波频率为 50 kHz 时采用连续超声波法和间歇超声波法 (超声作用 30 s 间隔 30 s) 处理，作用总时间分别为 1 min、2 min、3 min、4 min、5 min、6 min、10 min。试验重复三次，取平均值

1.5.2 超声波法作用条件对 *V. parahaemolyticus* 生物菌膜解离作用的影响

用在 1.5.1 试验中得到的最佳超声波作用方式处理玻璃表面的副溶血弧菌生物菌膜, 在超声波清洗器中选用 30 kHz、40 kHz、50 kHz 分别超声作用 1 min、2 min、3 min、4 min、5 min、6 min、10 min 后取出, 同时设置对照组 (用无菌脱脂棉反复擦拭附有生物菌膜的盖玻片后涡旋震荡以使生物膜完全脱落)。试验重复三次, 取平均值。

1.6 细菌平板菌落计数

按照 1.5.1 和 1.5.2 的操作将所得的菌悬液均以 1:10 梯度稀释, 选取合适的三个浓度, 各取 100 μ L 稀释液均匀涂布于胰蛋白胨大豆琼脂 (Tryptone soy agar, TSA) 培养基上, 于 37 $^{\circ}$ C 生化培养箱中培养 16~24 h 后取出进行菌落计数。试验重复三次, 取平均值。

1.7 数据分析

实验数据进行标准偏差分析, 采用 Origin 8.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 结晶紫染色法判定 *V. parahaemolyticus* 生物菌膜的形成

图 1 为副溶血弧菌在玻璃表面分别培养 0、12、24、36、48 h 后经结晶紫染色在显微镜下的可视图。

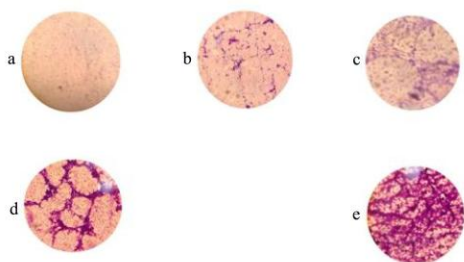


图 1 结晶紫染色法观察 *V. parahaemolyticus* 的生物菌膜
Fig.1 Formation of *V. parahaemolyticus* biofilms observed by crystal violet staining

注: a~e 分别表示培养 0、12、24、36、48 h 的 *V. parahaemolyticus* 生物菌膜在显微镜下 (100 \times 10) 观察图。

图 1a 为培养 0 h, 即空白盖玻片观察得到的图, 无紫色的菌体即无生物膜形成; 图 1b 为培养 12 h 后观察到的图, 可见已有明显的环状菌膜生成, 但菌体的生物量较小, 菌膜呈现稀疏松散的环状结构; 图 1c 为培养 24 h 的观察图, 图中菌环明显增粗, 相连的菌体数量明显增多, 副溶血弧菌的生物菌膜已经成熟; 图 1d 为培养 36 h 的生物菌膜的观察图, 较之, 可见

生物菌膜的网状结构变得更为紧密, 且形成有一定结构的菌环, 连接的菌数多。图 1e 为培养 48 h 的菌膜观察图, 可见大量的环状结构菌膜形成且结构规则紧密。由结晶紫染色法观察副溶血弧菌的生物菌膜的生长可知, 细菌从浮游菌状态到形成生物菌膜的过程是一个复杂但有序的过程, 随着浮游菌的附着到生物菌膜的形成, 生物菌膜从稀疏到紧密, 结构从简单到复杂, 生物菌体数量从少到多, 生物菌膜也逐渐成熟。这与李红爱等^[9]报道的单增李斯特菌生物菌膜的形成过程基本一致。

2.2 培养时间对副溶血弧菌生物菌膜生物量的影响

酶标仪在 595 nm 波长处对经过不同培养时间的副溶血弧菌生物菌膜的生物量进行测量, 得到的结果如图 2。

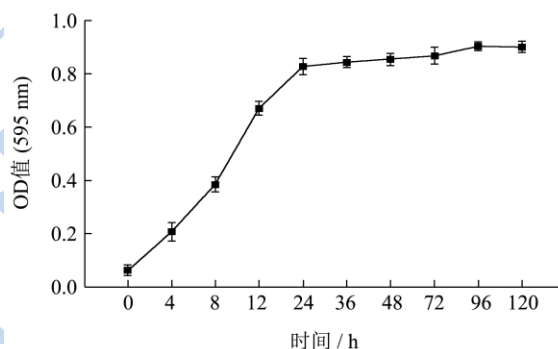


图 2 副溶血弧菌生物菌膜培养光密度值随时间的变化

Fig.2 Changes in the optical density of *V. parahaemolyticus* biofilms over time

随着培养时间的延长, 测得的副溶血弧菌生物菌膜的 OD 值逐渐增大即生物菌膜的生物量逐渐增多, 这进一步说明副溶血弧菌生物菌膜的形成是一个由少到多的过程。在 0~24 h 期间增长较快, 且在 24 h 已经基本成熟, 这与结晶紫染色法观察得到的结果相一致。24 h 以后生物菌膜生物量还处于增长阶段但增长速度没有前阶段快, 说明副溶血弧菌生物菌膜的生长达到一个接近平衡的状态, 这与 Dunne^[10]等关于微生物生物菌膜的生长研究得到的结果相同。本研究中副溶血弧菌生物菌膜在 24 h 后才趋于成熟, 不同于 Wong^[4]等的研究结果副溶血弧菌在玻璃表面培养 12 h 时已经成熟, 这是因为在本试验副溶血弧菌生物菌膜培养时由于培养液剪切力的作用, 起到了延缓生物菌膜成熟的效果。

2.3 盐度和培养方式对 *V. parahaemolyticus* 生

物菌膜生物量的影响

在使用不同盐度的培养基的条件下利用摇床模拟一定的剪切力,探索盐度和剪切力对副溶血弧菌生物菌膜生长的影响,得到的结果如图3。

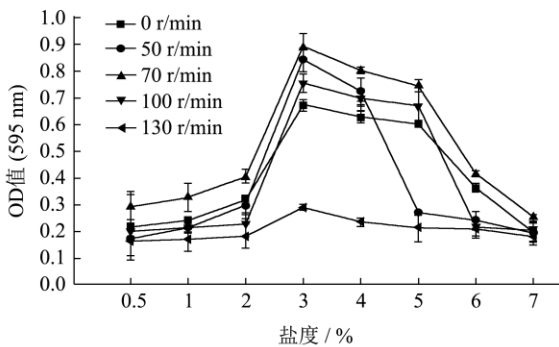


图3 副溶血弧菌生物菌膜培养光密度值随盐度和转速的变化

Fig.3 Influence of salinity and rotation speed on the optical density of *V. parahaemolyticus* biofilms

副溶血弧菌生物菌膜在玻璃表面生长的最佳盐度为3%~5%,这与陈珍等^[11]的研究结果一致,且盐度大小对于副溶血弧菌生物菌膜的生长影响很大。剪切力的大小对于副溶血弧菌生物菌膜影响复杂,当盐度为3%~5%,转速为50 r/min、70 r/min、100 r/min时,副溶血弧菌生物菌膜的生物量高于0 r/min即静置培养时的生物菌膜量;当盐度为3%~5%转速为130 r/min,副溶血弧菌生物菌膜生长量低于静置培养时副溶血弧菌生物菌膜的生物量。证实了剪切力对生物菌膜生长的影响是一个复杂但有一定规律的过程,低剪切力可以在一定程度上促进生物菌膜的生长且能增强生物菌膜的粘附强度,但剪切力高于一定限度,高剪切压力可以明显减少生物菌膜的生长。这与Rochex Alice等^[12]的研究结果吻合。本试验可得到在玻璃表面形成副溶血弧菌生物菌膜的最佳转速为70 r/min。

2.4 超声波法作用方式对玻璃表面 *V. parahaemolyticus* 生物菌膜解离效果的影响

超声波法已被证实能移除大肠杆菌、绿脓假单胞菌等的生物菌膜^[13-14],超声波清洗器常用于产生超声波,选用的频率一般为20 kHz~100 kHz。选用超声波作用频率50 kHz探索超声作用方式对微生物生物菌膜解离效果的影响。

从图4可知,在超声作用时间为1~4 min时,采用间歇式超声法解离出的副溶血弧菌生物菌膜中的菌体数明显多于连续式超声法解离出的副溶血弧菌数,可知间歇式超声法能更有效解离玻璃表面的副溶血弧

菌生物菌膜。在超声时间5 min后,两种不同的超声作用方式对解离出的副溶血弧菌的生物活性都造成了一定影响。随着超声时间的延长,副溶血弧菌生物活性逐渐降低,可知超声波作用时间会影响副溶血弧菌的生物活性。两种超声作用方式对副溶血弧菌生物活性影响之间的差异性很小,这也说明了副溶血弧菌生物活性的降低与超声波作用方式无关。

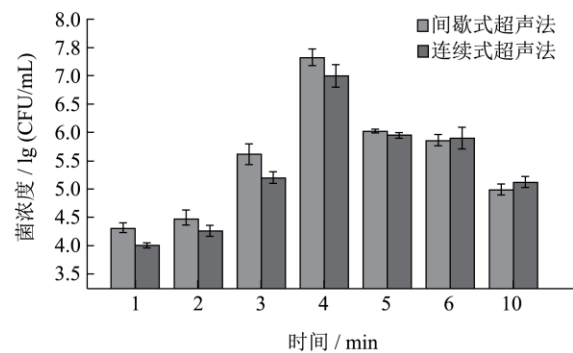


图4 超声波作用方式对玻璃表面副溶血弧菌生物菌膜解离的影响

Fig.4 Effect of various ultrasound treatments on *V. parahaemolyticus* biofilm detachment

2.5 超声波法作用条件对玻璃表面 *V. parahaemolyticus* 生物菌膜解离效果的影响

采用不同的超声波频率和时间作用于副溶血生物菌膜,探讨最佳的超声波作用条件。

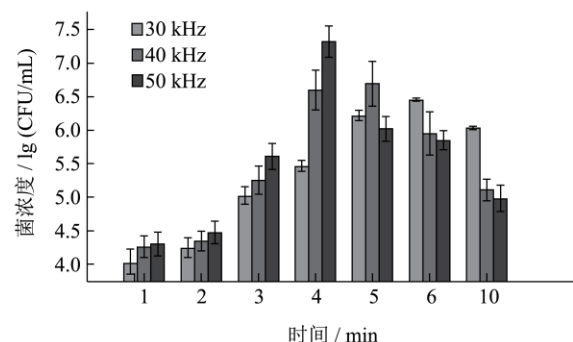


图5 超声波作用条件对玻璃表面副溶血弧菌生物菌膜解离的影响

Fig.5 Effect of ultrasound conditions on *V. parahaemolyticus* biofilm detachment

从图5可知,随着超声时间的延长,被解离出来的副溶血弧菌菌体增多,但超声时间过长会造成菌体的部分死亡,如50 kHz、作用5 min后菌体数目开始减少。在超声时间为1 min~4 min时,随着超声波频率的增大,被解离的菌体数目逐渐增多,表明这个时间阶段的解离不完全,且超声波没有损害菌体活性。

通过擦拭后涡旋震荡的方法得到的玻璃表面副溶血弧菌生物菌膜的菌体数为 2.56×10^7 CFU/cm², 使用超声波频率 50 kHz 作用 4 min 后解离的副溶血弧菌的菌体个数为 2.28×10^7 CFU/cm² 即解离了约为 89% 的副溶血弧菌菌体, 可见超声波法可较完整的从玻璃表面解离副溶血弧菌生物菌膜且保持其生物活性, 这为进一步研究生物菌膜的特性提供支持, 也解决了其它移除方法难以达到完全解离或损害生物菌膜活性的难题。

3 结论

副溶血弧菌可在玻璃表面形成生物菌膜, 且培养基盐度、培养时间、培养时转速(剪切力)对生物菌膜的生长成熟有很大的影响。通过结晶紫染色后可以在显微镜下直观的观察副溶血弧菌生物菌膜的形态。当培养基盐度为 3%、培养时转速为 70 r/min、培养时间为 24 h, 可以在玻璃表面得到生长成熟且粘附强度较大的副溶血弧菌生物菌膜。超声波作用方式、作用频率和作用时间可以影响生物菌膜的解离效果。本试验采用的间歇式超声法在超声波频率为 50 kHz 作用 4 min 时可解离玻璃表面约为 89% 的副溶血弧菌生物菌膜且保持菌体活性的效果。

参考文献

- [1] Blinco-Abad V, Ansele-Bermejo J, Rodriguez-Castro A, et al. Evaluation of different procedures for the optimized detection of *vibrio parahaemolyticus* in mussels and environmental samples [J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 129(30): 229-236
- [2] Chiou A, Chen L H, Chen S K. Food-bom illness in Taiwan, 1981-1989 [R]. Food Australia, 1991, 43: 70-71
- [3] Elexson N, Afsah-Hejri L, Rukayadi Y, et al. Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of antibiotica-resistant *vibrio parahaemolyticus* isolates [J]. Food Control, 2014, 35(1): 378-385
- [4] Wong H C, Chuang Y C, Yu J A. Attachment and inactivation of *vibrio parahaemolyticus* on stainless steel and glass surface [J]. Food Microbiology, 2002, 19(4): 341-350
- [5] Dourou D, Beachamp C S, Yoon Y, et al. Attachment and biofilm formation by *Escherichia Coli O157:H7* at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 149(3): 262-268
- [6] Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in food industry [J]. Journal of Applied Bacteriology, 2003, 75: 499-511
- [7] Jayani C, Christine O, Sandra K, et al. Ultrasonics in food processing [J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2012, 19(5): 975-983
- [8] Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough L A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 2950-2958
- [9] 李红爱,唐姝姝,唐书泽,等.亚甲基蓝对单增李斯特菌膜的光动力杀伤作用[J].食品科学,2014,35(3):139-142
LI Hong-ai, TANG Shu-shu, TANG Shu-ze, et al. Antimicrobial photodynamic activity of methylene blue against *Listeria monocytogenes* biofilms [J]. Food Science, 2014, 35(5): 139-142.
- [10] Dunne W M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? [J]. Clinical Microbiology, 2002, 15: 155-166
- [11] 陈珍,覃映雪,邹文政,等.致病性副溶血弧菌生物膜形成特性研究[J].海洋学报,2010,32(5):110-116
CHEN Zhen, TAN Ying-xue, ZHOU Wen-zheng, et al. Characteristics of biofilm formation of pathogenic *vibrio parahaemolyticus* [J]. Acta Oceanologica Sinica, 2010, 32(5): 110-116
- [12] Rochex A, Godon J J, Bernet N, et al. Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities [J]. Water Research, 2008, 42: 4915-4922
- [13] Peterson R V, Pitt W G. The effect of frequency and power density on the ultrasonically-enhanced killing of biofilm-sequestered *Escherichia coli*. [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2000, 17: 219-227
- [14] Carmen J C, Nelson J L, Beckstead B J. Ultrasonic-enhanced gentamicin transport through colony biofilms of *pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. [J]. Journal of Infection and Chemotherapy, 2004, 10(4): 193-199