

不同波长 UV 对副溶血性弧菌光修复反应的影响

苏泽红¹, 何淑雅¹, 李俐娟¹, 练高建², 高桥章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.德岛大学营养学部预防环境营养学分野, 日本德岛 770-8501)

摘要: 低压水银管是常见的灭菌工具, 其一般采用的是波长为 254 nm 的 UVC 作为灭菌光源。而 UVA (365 nm 波长) 配合发光二极管 (light-emitting diodes, LED) 也有明显的杀菌效果。本研究从灭菌能力, 照射后细菌的光修复能力和再生能力以及能耗等方面入手, 比较短波长的 UVC 和长波长的 UVA/LED 对副溶血性弧菌的灭菌效果。结果显示, UVA/LED 比 UVC 有更强的杀菌能力, 且在受到 UVA/LED 照射后, 副溶血性弧菌的再生明显慢于单纯 UVC 处理后的细菌; 对副溶血性弧菌的光修复酶基因表达水平进行检测发现, UVA/LED 照射后副溶血性弧菌三种光修复酶基因的表达水平都无激活现象, 而 UVC 处理后的细菌三种基因表达水平明显升高。我们认为 UVA/LED 可能抑制副溶血性弧菌的光修复现象。但在具备以上优势的同时, UVA/LED 的能耗大大高于 UVC, 因此该技术还有待进一步改进。

关键词: 紫外照射; 副溶血性弧菌; 光修复反应; 发光二极管

文章编号: 1673-9078(2013)12-2889-2893

Effect of Different Wavelength Ultraviolet Radiation on Photoreactivation in *Vibrio parahaemolyticus*

SU Ze-hong¹, HE Shu-ya¹, LI Li-juan¹, LIAN Gao-jian², AKIRA Takahashi³

(1.Department of Biotechnology, School of Pharmacology and Life Sciences and Technology, University of South China, Hengyang 421001, China) (2.Department of Experimental Zoology, University of South China, Hengyang 421001, China)

(3.Department of Preventive and Environment Nutrition, Tokushima University, Tokushima, 770-8501, Japan)

Abstract: The low pressure mercury lamp is used as a common tool for disinfection, with wavelength 254 nm as light source. Previous results suggested that when connected with light-emitting diodes (LED), UVA could kill bacterial effectively. In this research, we found that the disinfection effect of UVA/LED was much stronger than that of UVC; meanwhile, the regeneration of *Vibrio parahaemolyticus* after radiated by UVA/LED was more slowly than that only exposed by UVC. The results showed that photoreactivation did not happen in *Vibrio parahaemolyticus* after radiation by UVA/LED, and gene expression of photoreactivation related enzymes was not induced either. However, after UVC radiation, the photoreactivation happened and the gene expression level of photolyase increased. Thus results indicated that UVA/LED might inhibit photoreactivation in *vibrio paraheamolyticus*. Nevertheless, UVA/LED equipment needs much higher energy than UVC disinfection device, which should be improved.

Key words: ultra violet radiation; *Vibrio parahaemolyticus*; photoreactivation; light-emitting diodes

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, V.p) 是一种嗜盐性革兰氏阴性菌, 主要分布在近海岸的海水、海河交界处和鱼类、贝类、虾类等海产品中^[1-2]。进食生的或未煮透的海产品, 尤其是被该菌污染了的贝类,

收稿日期: 2013-08-27

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (13JJ3081); 湖南省教育厅项目 (12C0360); 南华大学博士启动基金项目 (2011XQD54)

作者简介: 苏泽红 (1976-), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向: 预防环境营养学

通讯作者: 练高建 (1976-), 男, 博士, 讲师, 主要研究方向: 生物化学与分子生物学

会导致急性肠胃炎, 其临床症状表现为腹泻, 头痛, 呕吐, 恶心, 痉挛和低烧^[3]。在许多亚洲国家, 包括中国和日本, 副溶血性弧菌被认为是食源性疾病的一个普遍因素, 在美国也被认为是与生食海鲜引起的肠胃炎的主要原因^[4]。

由于无残留, 也不会使细菌产生抗药性, 紫外 (UV) 光照射一般被认为是一种杀灭海产品中副溶血性弧菌的有效方法^[5]。通常, 用于消毒的是低压水银管, 该水银管利用波长为 254 nm (UVC) 的紫外光作为光源^[6-7]。在其使用寿命结束以后, 水银管必将被销毁, 然而, 由于水银管中含有水银, 销毁时产生的水

银必将造成环境的污染。此外,早在上个世纪八十年代就有数据表明,副溶血性弧菌在受到紫外照射后,有光修复现象^[8],该现象使紫外灭菌的效果大打折扣。因此,寻求一种更环保更有效的灭菌方式已经势在必行。

普通的UVA灯管无灭菌能力,但有研究表明,当UVA跟LED(发光二极管)合用时,有明显的灭菌效果。近年来,由于使用寿命长,对环境无污染,对人眼睛和皮肤伤害也小等优点,UVA/LED(UVA-发光二极管,365 nm)被开发用于水、蔬菜和空气的消毒^[9]。

本文从灭菌能力、灭菌后光修复能力、再生长能力以及能量消耗等方面分析两种不同波长的UV对副溶血性弧菌灭菌效果上的区别和各自的优势,为UVA/LED在食品、医疗器械、药物等方面灭菌的开发和利用打下基础。

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℃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 UVA/LED灭菌仪(图1a)

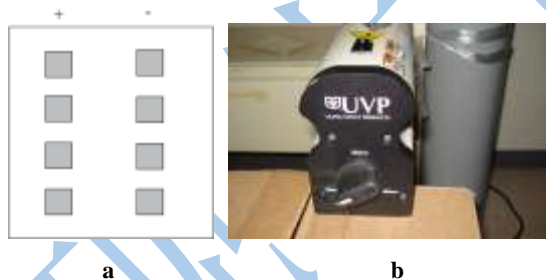


图1 UVA/LED灭菌灯和UVC紫外照射灯。

Fig.1 Equipments of UVA/LED and UVC sterilization

注: a: UVA/LED灭菌仪示意图,方框表示LED灯; b: 紫外灭菌灯,可选择不同波长进行照射。

八个LED灯平均分布于面板两侧,面板与电源相连,将菌液置于96孔板内对应于LED灯的孔内进行照射。

1.1.3 UVC灭菌灯(图1b)

将菌液置于96孔板内,置于灭菌灯正下方进行照射。

1.2 生物信息学分析

从Genebank中筛选副溶血性弧菌(RIMD 2210633)的光修复酶,其中VPA1471, VPA0203为脱氧核糖二嘧啶光解酶, VPA0204则为功能未知的假定蛋白,三个基因都位于II号染色体上^[10]。

1.3 实验方法

1.3.1 UVC和UVA/LED辐照后副溶血性弧菌的存活率

取备好的菌悬液放入96孔细胞培养板,每孔加200 μL菌悬液,置于UVC或UVA/LED灯管下进行辐照30分钟;期间每10 min取一次样,处理结束后,分别收集菌液,并稀释至一定浓度后,取100 μL涂布到含3% NaCl的LB培养基上,于37℃下培养16~18 h,观察菌落,计数,计算存活率,并将存活率取对数。

1.3.2 相同致死率下UVC和UVA/LED光修复情况比较

将菌悬液加入96孔细胞培养板,每孔加200 μL菌悬液,调整UVC和UVA-LED光密度和电流,使两种不同波长的紫外照射35 min后, V_p的存活率均约为1%,再用相同(0.3 mw/cm²)光密度的蓝光(λ_{365/405 nm})照射3 h,每隔1 h收集部分样品,稀释至一定浓度后取100 μL涂布到含3% NaCl的LB培养基上,于37℃下培养16~18 h,观察菌落,计数,计算存活率,并将存活率取对数。

1.3.3 相同致死率下UVC和UVA/LED光修复酶的基因表达情况比较

按照1.3.2方法处理菌悬液,一部分样品用于计算存活率,另取部分菌液离心,TRIzol法抽提RNA,逆转录为cDNA。以cDNA为模板用实时定量PCR(qRT-PCR)的方法检测光修复酶相关的三种基因(vpa1471、vpa0203、vpa0204)的表达水平,引物见表1,引物根据Genbank公布的副溶血性弧菌基因组来设计(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_004605.1?from=1570616&to=1572031&report=genbank&strand=true; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_004605.1?from=204460&to=205797&report=genbank; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_004605.1?from=205798&to=207342&report=genbank)。qRT-PCR使用QuantiTect SYBR green试剂盒(QIAGEN公司),仪器为Roche公司的Light Cycle II。qRT-PCR条件为:50℃ 30 min合成cDNA,95℃灭活15 min;然后进行40个循环的PCR,变性:94℃ 15 s;退火:58℃ 20 s;

延伸: 72 °C 30 s。用Light Cycle所带软件(版本: 3.5.3)进行数据分析, 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 各基因qRT-PCR引物

Table 1 qRT-PCR primers for genes		
基因名	上游引物	下游引物
<i>vpa1417</i>	cgcacgttagaccacacggc	ggcgtcttgagcatgtcat
<i>vpa0203</i>	tcgcccttcagtaactcctt	attcagacgcaatggctggc
<i>vpa0204</i>	gacgggtggagcagcaatcca	gatattgcgcaggtagaagg

1.3.4 UVC和UVA/LED照射致相同死亡率后生长情况比较

按照1.3.2方法处理菌悬液后分四组, A组为对照组, 不照射; B组用UVA/LED照射6 min; C组用UVC照射; M组用UVA/LED(0.28 A)与UVC(0.07 mw/cm²)共同照射6 min。照射后从0 h开始, 每隔7 h检测细菌生长情况。

2 结果与讨论

2.1 UVC和UVA/LED辐照后副溶血性弧菌的存活率比较

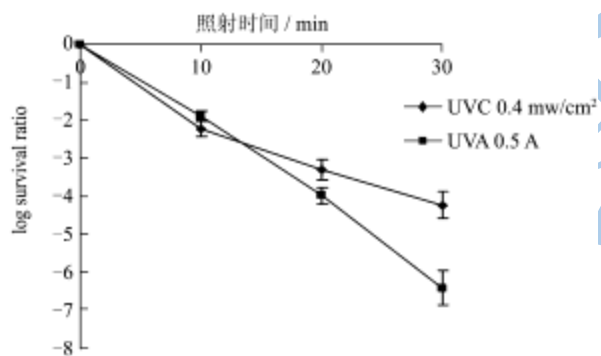


图2 UVC和UVA/LED分别照射30分钟副溶血性弧菌存活率变化

Fig.2 Log survival ratio of *Vp* after exposed by UVC and UVA/LED for 30 minutes

UVC和UVA/LED分别照射30 min后, 副溶血性弧菌的存活率有所区别, 经过UVA/LED处理的样品, 其存活率明显低于UVC处理后的样品, 其中UVC照射30分钟后, 副溶血性弧菌的存活率为0.01%, 而UVA/LED处理的样品存活率则比前者降低了2个数量级, 即为0.0001% (图2)。结果表明, UVA/LED明显比UVC的灭菌能力强。

2.2 相同致死率下UVC和UVA/LED光修复情况比较

结果如图3显示, UVC照射后的副溶血性弧菌有明显的光修复现象, 且随时间延长, 光修复能力增强 (图3a)。UVA/LED照射后的细菌无明显的光修复现象, 且较短波长(365 nm)的UVA继续照射导致细菌数量进一步减少, 而较长波长(405 nm)的UVA继续照射则不影响细菌存活率 (图3b)。具体机制尚不明确, 推测可能较短波长的UVA能量更高, 从而导致UVA/LED照射后的一些细菌进一步死亡。

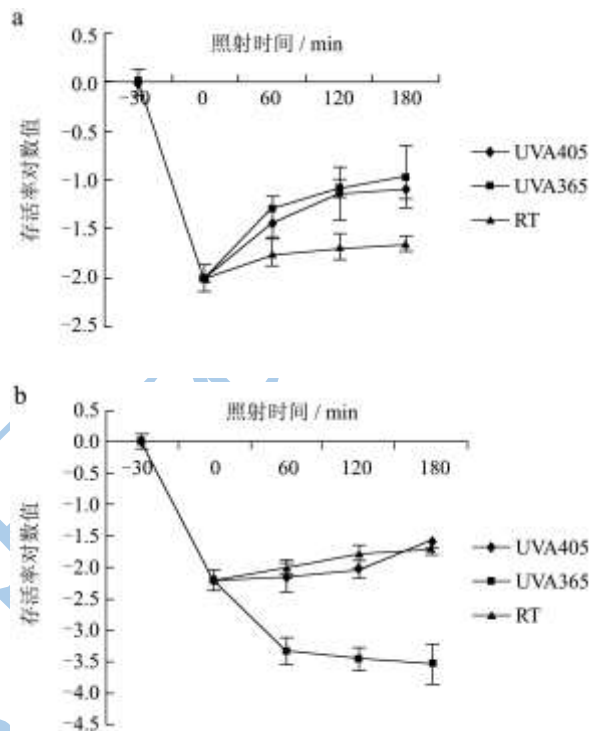


图3 不同波长的紫外照射副溶血性弧菌30分钟后的光修复情况

Fig.3 Photoreactivation of *Vp* after exposed by different wavelength ultraviolet for 30 min

注: 横坐标为照射时间, -30到0表示辐照时间, 0到180表示低能量UVA照射的时间, 纵坐标为细菌存活率取对数。图a为UVC照射, 图b为UVA-LED照射。

2.3 相同致死率下UVC和UVA/LED光修复酶的基因表达情况比较

调整合适的光密度和电流, 分别使UVC和UVA/LED照射副溶血性弧菌30 min使其存活率约为1%后, 再用低能量UVA照射3 h, 并设室温暗室内放置3 h为对照, 每隔1 h取样品提取总RNA, 逆转录后用qRT-PCR法检测*vpa1417*, *vpa0203*和*vpa0204*三个光修复酶相关基因的表达量。结果显示, 在接受UVC辐照后, 再在低能量UVA照射三小时内表达量明显升高, 其中365 nm波长和405 nm波长的照射没

有显著差异。vpa1471 表达量变化最小, 3 h 内最多增加 4 倍 (图 4a); vpa0203 表达量增加最显著, 最高可增加 28 倍 (图 4b); vpa0204 在低能量 UVA 照射 3 h 后, 其表达量可增加 10 倍左右 (图 4c)。而在接受 UVC 辐照后再处于室温暗室条件下的副溶血性弧菌, 三种光修复酶相关基因的表达量没有升高。与此相反, UVA-LED 处理过的副溶血性弧菌, 三种基因表达量均无升高现象 (图 5)。该结果提示, UVC 辐照后的副溶血性弧菌光修复酶相关基因被激活, 而 UVA-LED 对光修复酶相关基因无激活作用。

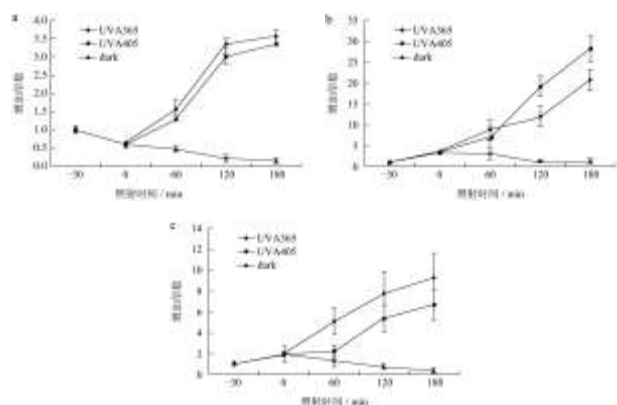


图 4 在接受 UVC 辐照后再进行低能量的 UVA (365nm/405nm) 的照射, 副溶血性弧菌三个光修复酶相关基因表达量的变化
Fig.4 Three gene expression level changes of photolyase after UVC radiation and then irradiated by low energy UVA (365 nm/405 nm)

注: a: vpa1471 基因表达量变化, b: vpa0203 基因表达量变化, c: vpa0204 基因表达量变化。纵坐标为基因表达量增加倍数, 横坐标为照射时间, -30 到 0 表示 UVC 照射 30 min, 0 到 180 表示之后进行的低能量 UVA 照射时间。

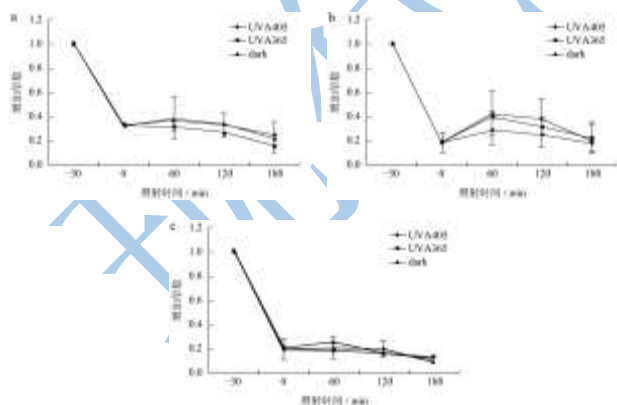


图 5 在接受 UVA/LED 辐照后再进行低能量的 UVA (365nm/405nm) 的照射, 副溶血性弧菌三个光修复酶相关基因表达量的变化
Fig.5 Three gene expression level changes of photolyase after UVA/LED radiation and then irradiated by low energy UVA (365 nm/405 nm)

注: a: vpa1471 基因表达量变化, b: vpa0203 基因表达

量变化, c: vpa 0304 基因表达量变化。纵坐标为基因表达量增加倍数, 横坐标为照射时间, -30 到 0 表示 UVA/LED 照射 30 min, 0 到 180 表示之后进行的低能量 UVA 照射时间。

2.4 UVC 和 UVA-LED 照射致相同死亡率后生长情况比较

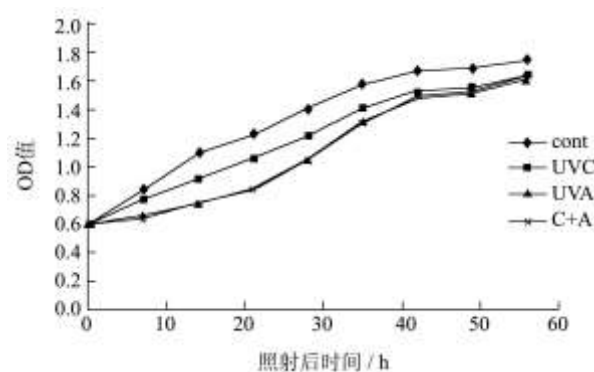


图 6 不同波长的紫外光照射副溶血性弧菌后生长情况

Fig.6 The growth curve of V.p after exposed under different wavelength ultraviolet

注: 纵坐标为 OD 值, 横坐标为照射后静置的时间; Cont: 无照射的对照组; UVC: 只接受了 UVC 的照射; UVA: 只接受了 UVA/LED 的照射; C+A: 同时接受 UVC 和 UVA/LED 的照射。

如图 6 所示, 在被 UVA/LED 或 UVA/LED 混合 UVC 照射后, 副溶血性弧菌明显较只有 UVC 照射的细菌生长缓慢。在照射后 5 h 内, 有明显的光修复现象, OD 值升高。而 UVA/LED 或 UVA/LED 混合 UVC 照射后的细菌则生长缓慢, 照射 5 h 内无明显的光修复现象。由结果可推测, UVA/LED 可能抑制副溶血性弧菌的光修复现象。

3 结论

3.1 本研究显示, UVA/LED 比 UVC 能更有效地杀灭副溶血性弧菌, 且经过 UVA/LED 处理过的细菌生长更加缓慢, 无光修复能力, 其光修复相关基因的表达也无激活现象。而 UVC 处理过的细菌则有明显的光修复能力, 其光修复酶相关基因的表达受到激活。

3.2 通常, 紫外光照射被认为是一种杀灭海产品中副溶血性弧菌的有效方法。但是因为在自然界中, 细菌能利用弱紫外光的能量进行光修复, 从而提高细菌的存活率。因此, 如果能利用紫外配合发光二极管照射来灭菌, 不仅杀菌能力大大提高, 且照射后又不会发生光修复反应, 则能大大提高灭菌效率, 其对环境的无污染更是提高其环保系数。

3.3 当然, 能量的消耗也是我们要考虑的一个方面。

我们测量的数据显示, UVC照射副溶血性弧菌至其存活率约为1%时, 所需能量为0.126焦耳, 而用UVA/LED照射副溶血性弧菌至同样存活率时所需能量为7.6焦耳, 为UVC照射所需能量的60倍。该数据表明, UVA配合双极光能有效地抑制副溶血性弧菌的光修复现象, 从而提高杀菌率, 但能耗也大大增加。因此, 长波长的紫外光配合双极光(LED)的杀菌技术还有待于进一步改进, 使其具备更高的推广应用价值。作者认为该设备可通过减少波长数来降低能耗, 具体改进技术和效果还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 苏泽红, 练高建, 余美华, 等. 脉冲高电压对副溶血性弧菌病原性的影响[J]. 现代食品科技, 2012, 28(7): 743-745
Su Zehong, Lian Gaojian, She Meihua, et al. Effect of pulse electric fields on the pathogenic of vibrio parahaemolyticus [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(7): 743-745
- [2] 丁珊珊, 杨振泉, 李宝利, 等. 柠檬酸和温度联合处理对海水鱼中副溶血性弧菌的杀灭作用[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(2): 205-209
Ding Shanshan, Yang Zhenquan, Li Baoli, et al. Sterilization function of citric acid combined with temperature on vibrio parahaemolyticus in the marine fishes [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2013, 29(2): 205-209
- [3] Yi Cheng Su, Cheng chu Liu. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety [J]. Food Microbiology, 2007, 24(6): 549-558
- [4] Yeung PS, Boor KJ. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections [J]. Foodborne Pathog Dis., 2004, 1(2): 74-88
- [5] M Mori, A Hamamoto, A Takahashi. Development of a new water sterilization device with a 365 nm UV-LED [J]. Med Bio Eng Comput, 2007, 45(12): 1237-1241
- [6] Oppenheimer JA, Jacangelo JG, Laine JM, et al. Testing the equivalency of ultraviolet light and chlorine for disinfection of wastewater to reclamation standards [J]. Water Environ. Res., 1997, 69: 14-24
- [7] Oguma K, Katayama H, Ohgaki S. Photoreactivation of *Legionella pneumophila* after inactivation by low or medium pressure ultraviolet lamp [J]. Water Res., 2004, 38: 2757-2763
- [8] Okaichi K, Ohnishi T, Nozu K. Photoreactivation of UV-killing in *Vibrio parahaemolyticus* WP28 [J]. Photochem. Photobiol., 1984, 6: 771-773
- [9] Hamamoto A, Mori M, Takahashi A, et al. New water disinfection system using UVA-LED [J]. J. Applied Microbiol. 2007, 103: 2291-2298
- [10] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae* [J]. Lancet, 2003, 361(9359): 743-749