

文章编号: 1674-5566(2025)03-0674-12

DOI: 10.12024/jsou.20240404493

胆盐胁迫下不同毒力基因型副溶血性弧菌混合生物被膜异质性

谷 鑫¹, 潘迎捷^{1,2,3}, 赵 勇^{1,2,3}, 刘海泉^{1,2,3,4}

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306; 3. 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306; 4. 上海海洋大学 食品热加工工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要: 为了解在纯培养条件及胆盐胁迫下来源于淡水产品的不同毒力基因型副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)单个及混合菌株生物被膜的形成特征, 通过结晶紫染色法和CCK-8法检测生物被膜的形成量和细胞活力, 并借助共聚焦激光扫描显微镜(Confocal laser scanning microscopy, CLSM)对被膜结构进行可视化观察, 最后通过二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)法及苯酚-硫酸法对胆盐处理前后的被膜胞外蛋白和胞外多糖含量进行定量分析。结果表明, 胆盐处理抑制副溶血性弧菌生物被膜的形成, 使被膜形成量和细胞活力显著下降, 影响被膜系统的聚集程度和混乱程度, 破坏被膜结构的同时影响胞外蛋白和胞外多糖的合成和分泌。含有tdh基因的菌株能够形成较多且较稳定的生物被膜, 混合菌株在胆盐刺激下表现出更强的适应性, 能够迅速做出响应以抵御这种胁迫, 从而保证菌体更加稳定地存活。这一研究结果为副溶血性弧菌混合生物被膜的形成和控制提供了新的理论支持, 对于探讨淡水产品中携带副溶血性弧菌对食品安全和人体健康造成的影响具有重要意义, 为进一步研究其在人体肠道中的适应机制和防控提供了重要参考依据。

关键词: 副溶血性弧菌; 胆盐胁迫; 混合生物被膜; 淡水产品来源

中图分类号: TS 201.3 **文献标志码:** A

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种革兰氏阴性嗜盐球杆菌, 普遍存在于海洋、河口生态系统及水产品^[1-4](如牡蛎、鱼、贝和虾等)中, 当人类摄入被VP污染的未煮熟或生的海鲜时, 其致病菌株能够侵入并定殖消化道, 导致急性胃肠炎和其他并发症^[5-6]。VP具有丰富的毒力因子, 最常见的主要致病毒素是热稳定性直接溶血素(TDH)和热稳定性相关溶血素(TRH), 它们的编码基因tdh和trh常被用作VP致病性检测的特异基因, 这两种毒素被认为会在宿主细胞中引起溶血和细胞毒性^[7-8]。Ⅲ型分泌系统(T3SS)作为VP另一个重要的毒力因子, 也与其致病性有关^[7], 其中T3SS2在感染人类时会引起肠胃炎相关症状^[9], 且在决定菌株的环境适应性方面也起着至关重要的作用^[10-11], 由第二染色体上的致病岛(Vp-PAI)编码^[12], 该Vp-PAI也编码

TDH^[9]。另外, 当VP随海鲜一起被人类摄入时会与胃肠道中的胆盐接触, 胆盐对通过肠道的细菌具有应激作用, 同时致病菌利用胆盐作为肠道信号来调节毒力因子^[13], 对胆盐具有特异性反应的调节网络可以激活由Vp-PAI编码的T3SS2的表达^[14]。食源性致病菌要想在含有胆盐的小肠中生存并引发疾病, 必须具备一定程度的耐受性, 以抵抗和响应这一胁迫。

VP能够在双鞭毛系统的辅助下自由移动以适应不同变化的环境并定殖, 进而形成生物被膜^[15-16]。大多数生物被膜中, 微生物占干质量的比例很小, 胞外聚合物(Extracellular polymeric substances, EPS)占生物被膜干质量的90%以上^[17], 主要包括eDNA、胞外蛋白和胞外多糖。研究^[18-20]表明, 胞外多糖在生物被膜中起着关键作用, 不仅能促进膜内细胞间的相互作用, 还能够

收稿日期: 2024-04-12 修回日期: 2024-07-30

基金项目: 上海市科学技术委员会食源性致病菌耐药机制及耐药性风险评估研究项目(21XD1401200)

作者简介: 谷 鑫(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食源性致病菌风险评估。E-mail: gx178640@163.com

通信作者: 赵 勇, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydxxb.com>

抵御环境和宿主的压力以保护内部的细菌细胞。同时,胞外蛋白对于维持细菌生物被膜的三维结构完整性和表面黏附性至关重要^[21-22]。LI 等^[23]阐明了 eDNA、胞外蛋白和胞外多糖分别在副溶血性弧菌生物被膜形成中的作用。确定了副溶血性弧菌生物被膜形成量与 eDNA 和蛋白质含量呈正相关($P<0.01$),但与碳水化合物含量无相关性。生物被膜的形成对微生物的生长、代谢、抗生性等方面都有着重要影响,能增强菌体对抗生素^[24]、紫外线^[25]和其他外部压力的抵抗能力,成为一种确保细菌生存的微生物防御机制^[26],是食源性致病菌传播的主要原因。此前已有许多研究描述了单种菌株生物被膜的形成^[27-28],而混合生物被膜在各种微生物行为上与单菌种相比存在差异^[29],相互作用更加复杂,适应环境变化也更加灵活,因此科学的研究混合生物被膜至关重要。

随着中国居民饮食结构的改变,淡水产品已成为中国零售水产品市场总量的重要组成部分,现已被报道为食源性致病菌传播的潜在媒介;而日益发展的沿海和内陆地区之间的物流运输和消费互通,使得致病性嗜盐弧菌不断从我国沿海向内陆地区扩散^[30-31],其污染也逐渐呈现由海产品向淡水产品转移的趋势,成为内陆地区不容忽视的食品安全风险隐患。因此,本文研究了在纯培养条件及胆盐胁迫下来源于淡水产品的不同毒力基因型副溶血性弧菌单个及混合菌株生物被膜的形成特征差异,通过检测生物被膜的形成量、被膜结构和细胞活力,以及对胞外蛋白和胞外多糖含量进行定量检测,阐明生物被膜对胆盐的响应模式,从而为副溶血性弧菌生物被膜的控制提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

主要材料:硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium, TCBS, 北京陆桥技术有限责任公司);胰蛋白胨大豆肉汤培养基(Trypticase Soy Broth, TSB, 北京陆桥技术有限责任公司);20×磷酸盐缓冲液[PBS, 生工生物工程(上海)股份有限公司];结晶紫(北京索莱宝科技有限公司)

司);4% 戊二醛;SYBR Green I 染料(上海吉至生化科技有限公司);增强型 CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);苯酚(上海麦克林生化科技股份有限公司);无菌无酶细胞刮刀(常德比克曼生物科技有限公司);共聚焦培养皿。

仪器:OptiMair® 垂直流超净工作台(Eesco China 公司);恒温振荡器(HZQ-X300C, 上海一恒科学仪器有限公司);恒温培养箱(MIR-254, 上海一恒科学仪器有限公司);高速台式离心机(5804R, 德国 Eppendorf 公司);Bio-Tek 多功能酶标仪(Synergy™2 multi-mode microplate reader, 美国伯腾仪器有限公司);共聚焦激光扫描显微镜(Leica TCS SP8, 德国);超声波细胞破碎机(上海净信实业发展有限公司)。

1.2 副溶血性弧菌菌株选择及信息

本实验 3 株副溶血性弧菌的检测基因信息见文献[32],这些菌株保藏在农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海),菌株基因信息见表 1。

表 1 3 株副溶血性弧菌的毒力基因信息

Tab. 1 Information on virulence genes of three strains of VP

菌株编号 Strain number	毒力基因 Virulence gene			来源 Source
	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tlh</i>	
VPE36	-	+	+	淡水环境
VPE28	+	-	+	
VPE38	-	-	+	

1.3 实验方法

1.3.1 菌株的培养与活化

将-80 °C 冰箱甘油管中冻存的 VP 划线接种于 TCBS 琼脂上,于 37 °C 过夜孵育 10~12 h,挑取单菌落接种到含 3% NaCl 的 TSB 培养基中进行二次活化,37 °C 下摇床培养(200 r/min)后获得稳定的菌液培养基,将菌液稀释到 10⁸ CFU/mL。

1.3.2 制备含有胆盐的培养基

称取 0.06 g 和 0.12 g 胆盐于锥形瓶中,分别加入 200 mL 含 3% NaCl 的 TSB 培养基,高温灭菌 15 min 后得到质量浓度分别为 0.03 g/100 mL 和 0.06 g/100 mL 的含胆盐培养基^[33],备用。

1.3.3 生物被膜的培养

将细菌培养物和含3% NaCl的TSB培养基按比例转移到24孔板中进行生物被膜的培养。实验组见表2。

表2 培养基与菌液进行生物被膜培养的混合比例

Tab. 2 Mixture ratio of medium and liquid for biofilm culture

混合后名称 Mixed name	VPE36/ μL	VPE28/ μL	VPE38/ μL	含3% NaCl的TSB 培养基 TSB medium containing 3% NaCl/μL
VPE36	9	-	-	991
VPE28	-	9	-	991
VPE38	-	-	9	991
VPE-M1	4.5	4.5	-	991
VPE-M2	4.5	-	4.5	991
VPE-M3	-	4.5	4.5	991
VPE-AM	3	3	3	991

将只添加991 μL含3% NaCl的TSB培养基而不添加菌液的处理作为对照。同样地,将稳定菌液和含不同浓度胆盐的TSB培养基也分别按照表2比例加入24孔板中培养生物被膜。每组做3个平行,于25 °C静置培养12、24、36、48、60、72 h。

1.3.4 结晶紫染色法定量检测生物被膜形成量

生物被膜培养结束后,将24孔板取出,弃去上层菌液,每孔用0.01 mol/L PBS洗2~3次以除去浮游菌,在60 °C下放置30 min进行烘干。每孔加入1 mL 0.1%的结晶紫在室温下染色20~30 min,用0.01 mol/L PBS清洗3次以除去多余的结晶紫后,用1 mL 95%的乙醇溶解20 min,吹打搅拌使被膜悬浮,吸取200 μL至96孔板中,用酶标仪检测其在600 nm处的吸光度值(OD_{600})^[34]。

1.3.5 增强型CCK-8试剂盒检测生物被膜细胞活力

采用增强型CCK-8试剂盒检测生物被膜细胞活力^[35]。生物被膜培养结束后,弃去孔板中的菌液,用0.01 mol/L PBS缓冲液洗2~3次除去浮游菌。每孔中避光加入1 mL TSB培养基和100 μL的CCK-8溶液,在25 °C下避光培养2 h左右,用酶标仪检测其在450 nm处的吸光度值(OD_{450})。

1.3.6 共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)观察生物被膜结构

将单种和混合生物被膜直接形成在共聚

焦平皿上,按照1.3.3节的方法培养,培养至被膜形成量最大的时刻通过CLSM进行观察,参照文献[36]的方法并稍作改进。弃去平皿中悬浮的菌液,用0.01 mol/L PBS清洗3次,晾干后各加入1 mL 4%的戊二醛溶液在4 °C下固定30 min。用0.01 mol/L PBS清洗以除去多余的戊二醛(2~3次)后加入200 μL SYBR Green I染料,在室温下避光染色30 min。PBS冲洗干净后晾干,用CLSM[20×(40×)物镜,488 nm激发波长,500~550 nm吸收波长]观察生物被膜的结构。

1.3.7 胞外蛋白和胞外多糖含量的测定

检测副溶血性弧菌在纯培养和胆盐胁迫下生物被膜形成过程中的胞外多糖和胞外蛋白含量,在前人的操作上稍作改进^[23, 37]。具体步骤:生物被膜培养至形成量最大时,弃去孔板中的悬浮菌液,并用0.01 mol/L PBS清洗3次;每孔加1 mL 0.01 mol/L的KCl溶液重悬被膜,吹吸后转移至无菌离心管中,随后用超声波细胞破碎机进行超声处理(超声处理参数:每次5 s,4个循环,每个循环间隔5 s,功率45 W);在4 °C条件下离心20 min(4 000×g),离心得到的上清液用0.22 μm的滤膜过滤,留存备用。借助BCA蛋白浓度测定试剂盒测定胞外蛋白含量,通过苯酚-硫酸法测定胞外多糖含量。

1.3.8 数据处理与统计分析

实验设置3次重复,使用SPSS 26.0,采用One-way ANOVA和Duncan's检验进行统计学分析($P<0.05$)。通过Origin 2022软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同处理条件下副溶血性弧菌生物被膜形成能力分析

如图1所示,无论在哪种处理条件下,单个菌株和混合菌株生物被膜形成量皆随着时间的变化先增加到达峰值后再减少。在纯培养下(图1a)VPE36和VPE28在24 h达到最大形成量,且VPE28被膜形成量在单菌中最高,VPE38在36 h达到最大形成量,且被膜形成量在单菌中最低;混合菌株均在24 h达到最大形成量。胆盐胁迫下VP生物被膜形成量均比纯培养下低(图1b和1c),且所有混合菌株的生物被膜最大形成量都比对应单菌株多。0.03 g/100 mL胆盐胁迫下VPE28、

VPE38和混合生物被膜均在36 h达到被膜最大形成量,与纯培养下相比时间总体上后移(图1b),即生物被膜形成缓慢;0.06 g/100 mL胆盐胁迫下,所有菌株被膜形成量都大幅度减少,VPE38被膜形成量达到最大值的时间更加滞后(图1c),进一步

说明胆盐处理抑制了副溶血性弧菌生物被膜的形成。携带 tdh 基因的无论是单菌还是混合菌株,形成量都要比不携带 tdh 基因的菌株大得多,说明即使有外界的抑制因素影响,携带 tdh 基因的VP形成生物被膜的能力依然很强。

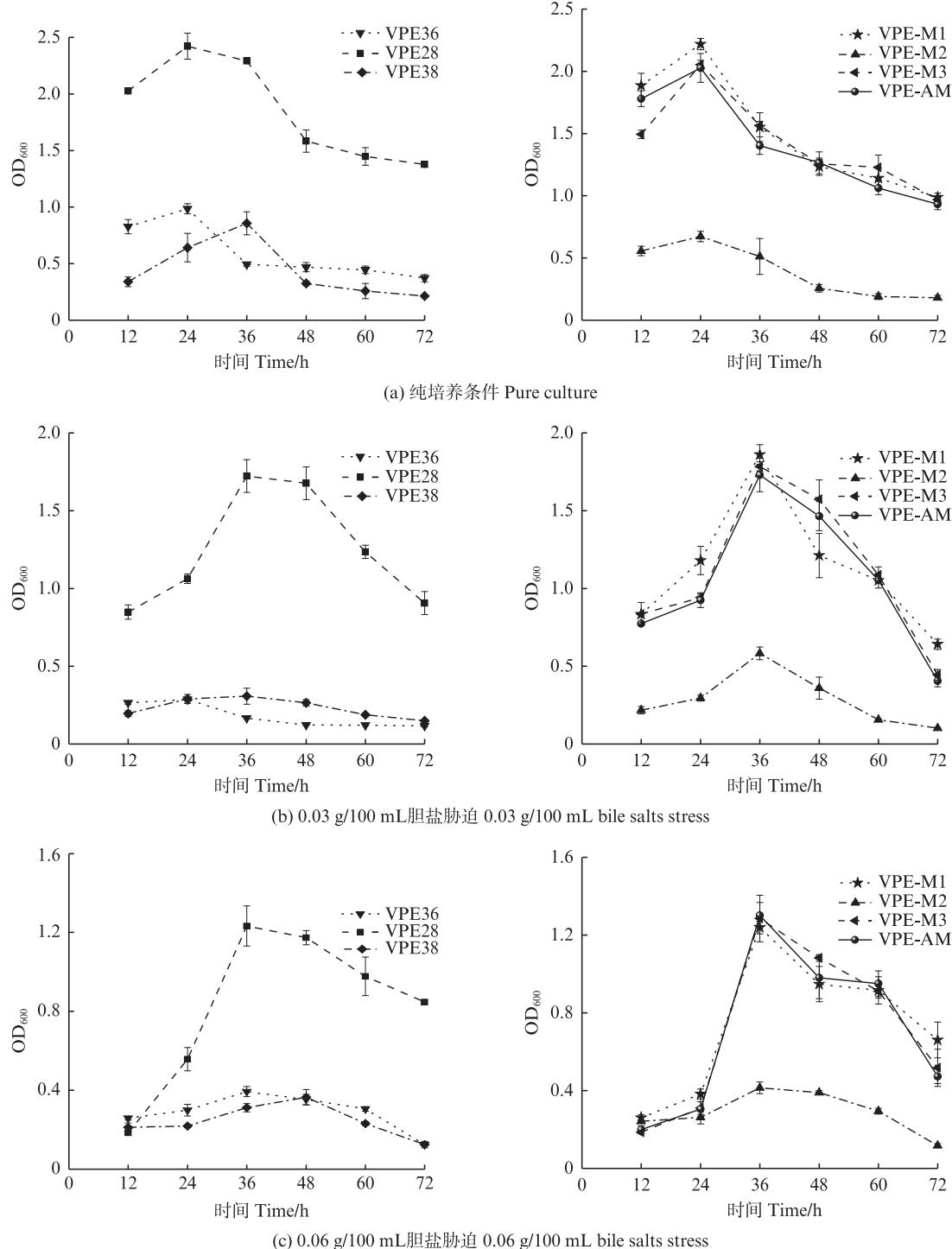


图1 3种处理条件下不同毒力基因型副溶血性弧菌随时间梯度变化的生物被膜形成量

Fig. 1 Biofilm formation of *V. parahaemolyticus* with different virulence genotypes under three treatment conditions as a function of time gradient

2.2 不同处理条件下副溶血性弧菌生物被膜细胞活力分析

如图2所示,无论在哪种处理条件下,副溶血性弧菌被膜菌的细胞活力皆随着时间的变化先增加到达峰值后再减少,且达到最大细胞活力的时刻与被膜最大形成量相同,说明生物被膜的形成过程与被膜菌细胞生长和代谢状态密切相关。不同的是,在纯培养条件下,虽然VPE28仍是所有菌株中细胞活力达到峰值时值最大的,但VPE28、VPE-M1及VPE-AM的细胞活力在整个时间梯度范围内都相差不大;在0.03 g/100 mL胆盐下,所有菌株生物被膜的细胞活力都比实验室纯培养的细胞活力要低,其中VPE36和VPE38以及混合菌株VPE-M2的细胞活力极低且变化波动不明显,而携带 tdh 基因的菌株虽然细胞活力也受到影响,但减少程度并不大;经0.06 g/100 mL的胆盐处理后,所有菌株细胞活力都大幅度减少,此时VPE-AM的最大细胞活力要低于除VPE-M2之外的其他两菌混合,且显著低于纯培养和0.03 g/100 mL胆盐处理条件,但携带 tdh 基因的无论是单菌还是混合菌株,细胞活力都要比不携带 tdh 基因的菌株大。

2.3 不同处理条件下生物被膜形成量及细胞活力显著性差异对比

将纯培养和两种浓度胆盐胁迫下的各菌株达到生物被膜最大形成量及细胞活力最大时进行显著性差异对比,由图3可知,0.06 g/100 mL胆盐处理后的被膜形成量和细胞活力检测结果与纯培养相比总的来说相差更大,所以在后续的实验中着重关注0.06 g/100 mL的胆盐胁迫。

2.4 CLSM观察不同处理条件对副溶血性弧菌生物被膜结构的影响

如图4所示,通过荧光分布可观察到纯培养条件下单菌种VPE28的生物被膜交联度最好,菌落与菌落连接最为紧密,形成带状结构甚至网状结构,VPE36次之,VPE38被膜结构最稀疏,形成量最少。在混合生物被膜中,VPE-M1与其他两菌混合被膜相比连接较为紧密,形成能力较强,但与单菌相比较为稀疏,空隙较大;VPE-M2与VPE-M3所形成的被膜菌微小且分散,多聚集成零星散落的块状结构,而VPE-AM生物被膜结构较为复杂,既有小而分散的块状结构又有交联紧密的带状结构,形成能力较其他混合被膜更强。

在0.06 g/100 mL浓度胆盐处理下(图5),VPE28的被膜不再致密黏连,分散成微小的点状结构,但在单菌中仍是被膜形成最强的,VPE36和VPE38被膜形成量极少,只能看出少数散落的被膜菌;对于混合生物被膜,VPE-M2形成极少,与其单菌被膜结构无明显差别,VPE-M3表现出最强的形成能力,仍能看出明显结合在一起的块状被膜结构且分布密集,VPE-AM被膜结构受到胆盐显著影响,散落成微小的点块且聚集度明显下降。

2.5 不同处理条件对生物被膜胞外蛋白和胞外多糖含量的影响

EPS是细菌生物被膜的主要成分^[17],由于eDNA含量在成熟生物被膜中占比很小^[23],因此通过测定生物被膜达到最大形成量时胞外蛋白和胞外多糖的含量来进一步反映胆盐处理后对生物被膜的影响。通过BCA法测定蛋白质含量,以葡萄糖为标准品及苯酚-硫酸法对生物被膜胞外多糖进行量化。

将所得OD值分别代入线性方程(图6a和6b),得出胞外蛋白和胞外多糖含量。胞外蛋白含量与生物被膜形成能力密切相关。由表3可见,在单菌中VPE28的生物被膜胞外蛋白含量显著高于VPE36和VPE38,混合菌株中,VPE-AM胞外蛋白含量低于其他两株含 tdh 的混合菌株;被胆盐处理过后的VP生物被膜胞外蛋白含量大幅度降低,VPE38蛋白含量甚至低至7.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$,虽然蛋白含量显著减少,但此时无论是单菌还是混合菌株,含有 tdh 基因的生物被膜胞外蛋白含量都要显著高于不含 tdh 基因的,且菌株间的含量对比情况与纯培养条件下大体一致。由表4可见,在纯培养下,VPE36的生物被膜胞外多糖含量要显著高于其他两株菌,而混合菌株VPE-M3生物被膜中胞外多糖含量最高,VPE-M1最低,这与生物被膜形成量和细胞活力的检测结果均不相符;但值得注意的是,胆盐胁迫后的菌株生物被膜胞外多糖含量对比与生物被膜最大形成量相吻合,VPE28生物被膜多糖含量仍是单菌中最多的,混合菌株中含有 tdh 基因的生物被膜多糖含量仍明显高于不含 tdh 基因的,说明胆盐胁迫可能通过影响菌株的代谢途径,影响胞外多糖的合成和分泌,从而影响生物被膜的形成。

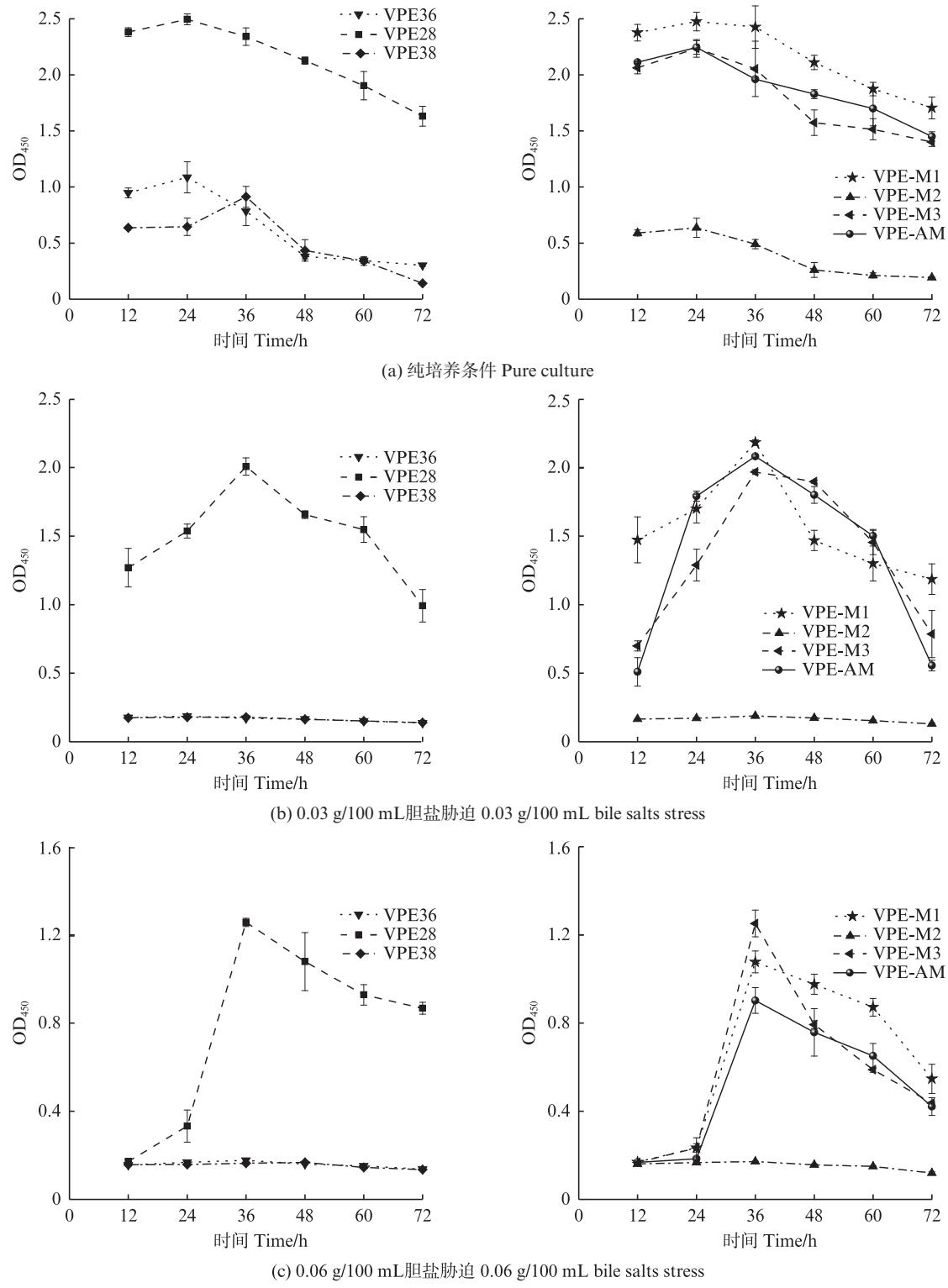
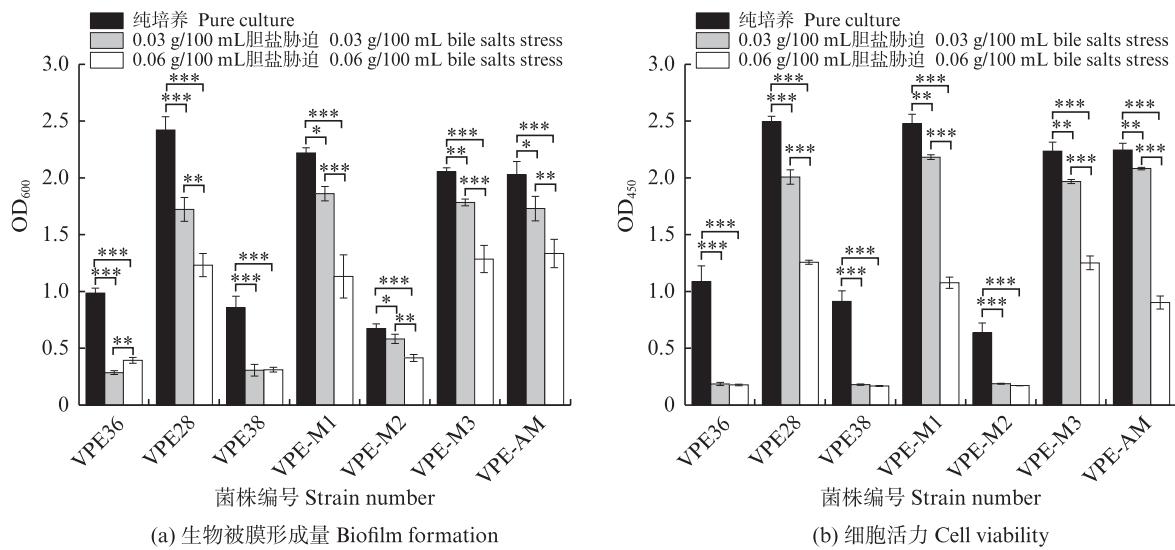


图2 3种处理条件下不同毒力基因型副溶血性弧菌随时间梯度变化的生物被膜细胞活力
Fig. 2 Biofilm cell viability of *V. parahaemolyticus* with different virulence genotypes under three treatment conditions as a function of time gradient



图中的*表示组间存在显著性差异($P<0.05$);*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$ 。

* in the figure indicates significant differences between groups ($P<0.05$); * indicates $P<0.05$, ** indicates $P<0.01$, *** indicates $P<0.001$.

图3 纯培养条件以及两种浓度胆盐胁迫下生物被膜形成量及细胞活力显著性差异对比

Fig. 3 Comparison of significant differences in biofilm formation and cell viability under pure culture conditions and two concentrations of bile salts stress

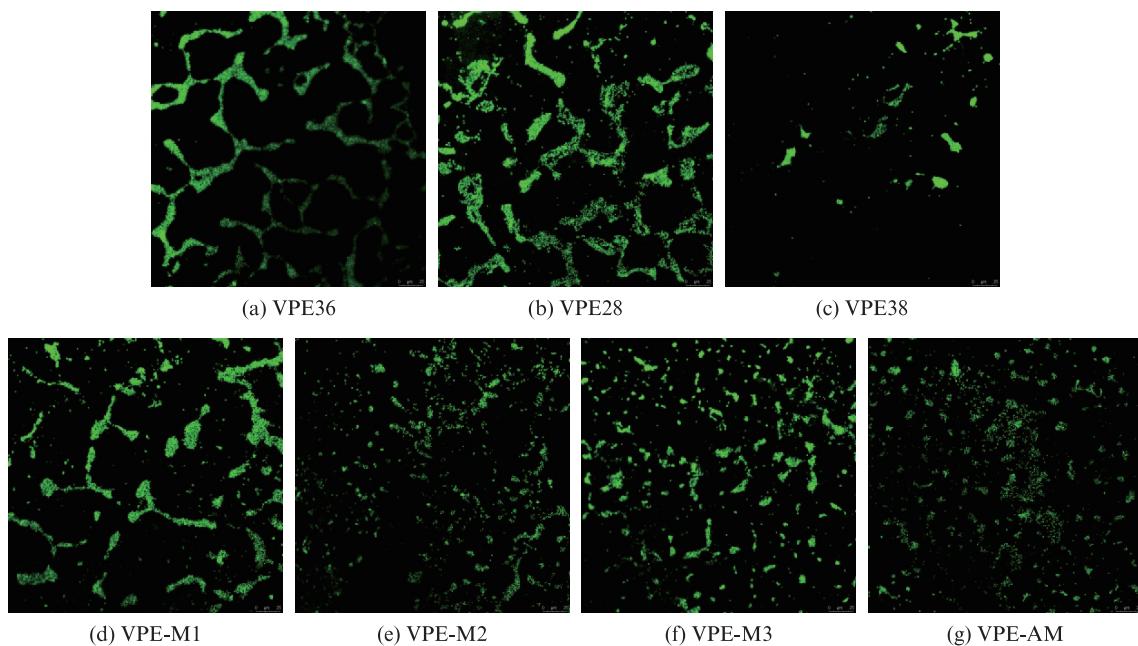


图4 纯培养条件下不同毒力基因型副溶血性弧菌单菌和混合菌株生物被膜的可视化结构

Fig. 4 Visual structure of biofilm of single and mixed strains of *V. parahaemolyticus* with different virulence genotypes under pure culture conditions

3 讨论

本研究通过对实验室纯培养和胆盐胁迫下来源于淡水产品不同毒力基因型的VP单个及混合菌株生物被膜形成过程中的差异进行研究,以结晶紫染色法和CCK-8法检测生物被膜形成量和细胞活力,利用CLSM对被膜结构进行可视

化,最后通过对胞外多糖和胞外蛋白的定量分析以整体反映胆盐处理对于淡水产品中VP生物被膜形成特征的影响。研究表明,含有tdh基因的菌株无论是纯培养还是胆盐胁迫条件下,都能够更好地应对多变的环境,从而能够更好地生存、定殖,含有tdh基因的菌株在生物被膜形成过程中相比于不含tdh基因的菌株更能对胆盐信号接

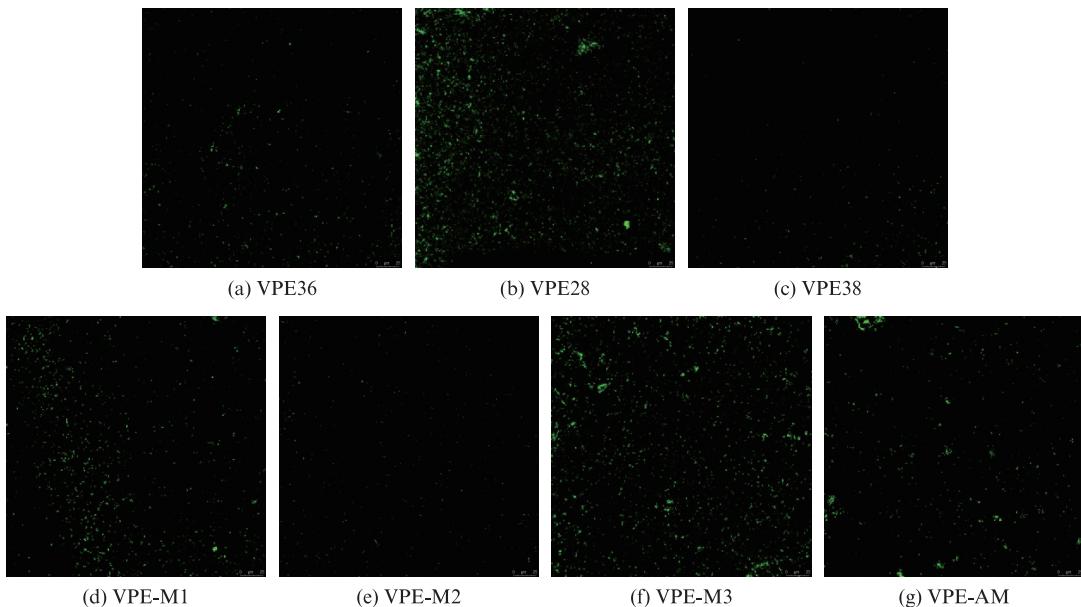


图5 0.06 g/100 mL 胆盐胁迫下不同毒力基因型副溶血性弧菌单菌和混合菌株生物被膜的可视化结构

Fig. 5 Visual structure of biofilm of single and mixed strains of *V. parahaemolyticus* with different virulence genotypes under 0.06 g/100 mL bile salts stress

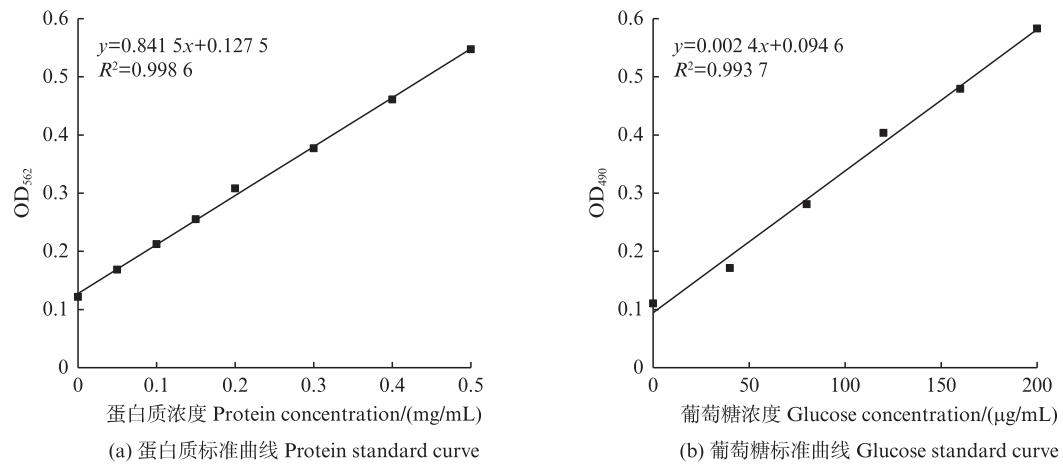


图6 蛋白质和葡萄糖标准曲线
Fig. 6 Standard curves for protein and glucose

收做出快速响应。刘冰宣^[38]研究了水产品中VP的生长异质性,发现基因型为 $tlh^+/tdh^+/trh^-$ 的菌株生长异质性最易发生变化;王扬眉^[39]模拟了VP在胃液中的生长异质性,发现基因型为 $tlh^+/tdh^+/trh^-$ 的菌株能够在胃液中稳定生存;江春铃^[40]分析了不同基因型临床来源的VP混合生物被膜异质性,发现基因型为 $tlh^+/tdh^+/trh^-$ 的菌株更易形成生物被膜,且包含该菌株的混合菌株生物被膜形成能力更强。这些结果都有力地证明了含有 tdh 基因的菌株能更好地适应环境的变化。

菌株的生物被膜形成受多方面因素(细菌种类、毒力基因、环境条件)影响,许多学者对环境

条件进行研究,姜黄素介导的光动力灭活对VP的感染、定殖及生物被膜形成具有阻碍作用^[41],酸性电解水能够破坏VP生物被膜的三维结构并阻止成熟生物被膜的重建^[42],温度的影响使得致病性和非致病性VP生物被膜形成出现异质性^[43]。胆盐作为肠道分子,在食物代谢消化过程中不断适应肠道菌群的变化,因其具有抗菌性能能够参与致病菌的控制和杀灭。胆盐能够诱导许多致病菌的生物被膜形成,如空肠弯曲杆菌、沙门氏菌和肺炎克雷伯氏菌^[44-46]。本研究中,胆盐抑制VP生物被膜的形成,在胆盐胁迫条件下所有VP菌株的生物被膜形成量和细胞活力与纯培

表3 不同处理条件下胞外蛋白含量
Tab. 3 Extracellular protein contents under different treatment conditions

菌株编号 Strain number	纯培养 Pure culture	0.06 g/100mL 胆盐胁迫 0.06 g/100mL bile salts stress	μg/mL
VPE36	97.33±0.68 ^b	10.58±1.91 ^d	
VPE28	121.37±2.34 ^a	55.02±4.44 ^a	
VPE38	30.38±3.40 ^c	7.65±0.85 ^d	
VPE-M1	120.54±4.80 ^a	36.52±3.74 ^b	
VPE-M2	90.24±4.25 ^b	12.08±2.06 ^d	
VPE-M3	115.27±2.70 ^a	31.02±0.51 ^c	
VPE-AM	90.91±8.69 ^b	28.08±1.65 ^c	

注:结果表示为平均值±标准偏差($n=3$),同一列不同字母表示存在统计学显著差异($P<0.05$)。

Notes: Results are expressed as Mean ± Standard deviation ($n=3$), and different letters in the same column indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

表4 不同处理条件下胞外多糖含量
Tab. 4 Extracellular polysaccharide contents under different treatment conditions

菌株编号 Strain number	纯培养 Pure culture	0.06 g/100 mL 胆盐胁迫 0.06 g/100 mL bile salts stress	μg/mL
VPE36	56.42±3.59 ^b	11.11±1.41 ^b	
VPE28	40.18±4.71 ^c	27.86±1.56 ^a	
VPE38	27.08±3.59 ^d	8.65±1.28 ^b	
VPE-M1	43.93±2.15 ^c	27.89±1.69 ^a	
VPE-M2	60.82±1.89 ^{ab}	11.43±1.59 ^b	
VPE-M3	66.99±1.70 ^a	29.76±4.46 ^a	
VPE-AM	54.61±4.77 ^b	27.01±1.70 ^a	

注:结果表示为平均值±标准偏差($n=3$),同一列不同字母表示存在统计学显著差异($P<0.05$)。

Notes: Results are expressed as Mean ± Standard deviation ($n=3$), and different letters in the same column indicate statistically significant differences ($P<0.05$).

养相比都显著降低,生物被膜结构被破坏且被膜系统的混乱程度和聚集程度被扰乱。混合菌株的被膜最大形成量多于单菌株,在不利条件下,混合菌株可能会相互协作,形成比单菌株更多的生物被膜以抵御胆盐的筛选压力。董旭日等^[47]研究了副溶血性弧菌和霍乱弧菌混合生物被膜的形成过程。在不同时间点下分别测定了菌株混合前后生物被膜的形成情况。结果表明,混合生物被膜虽然形成量在两菌株之间,但其成熟后对环境的抗性是增强的。结合本研究的结果,混合态的菌群可能具有更强的适应性,以增强其对宿主细胞的黏附能力同时保护自身免受宿主免

疫系统的攻击,从而提高了菌株在宿主体内定居、繁殖及对宿主的侵袭能力,因此混合菌株在胆盐胁迫下能够表现出比单个菌株更强的毒性和致病性,同时也意味着其在此条件下更难以清除。

已有许多研究^[23, 48]表明,胞外多糖含量与生物被膜形成之间没有相关性,尽管其含量很高。本研究在纯培养条件下,菌株的胞外多糖含量与被膜形成量也没有明显的一致性及规律,但胆盐处理后,菌株间的生物被膜胞外多糖含量对比却与最大形成量相吻合,说明胆盐胁迫影响了VP的生物被膜系统及被膜形成机制,使得胞外多糖在这个过程中扮演了更为重要的角色,从而使其含量发生变化以应对和适应其胁迫压力。含有tdh基因的菌株,其生物被膜经超声波细胞破碎、离心、过滤等操作后胞外蛋白和胞外多糖含量明显多于其他菌株,仍能传达出显著的生物信息,说明在外界恶劣信号的影响刺激下其能够迅速做出响应以适应胆盐胁迫环境,从而保证菌体更加稳定地存活。

因此,本研究通过对淡水产品来源的VP在纯培养条件及胆盐胁迫下的单个及种内混合生物被膜形成过程进行深入探究,揭示了单菌与混合菌株之间的被膜异质性及含有tdh基因的菌株对于胆盐环境的响应。这些研究成果为复杂混合生物被膜的形成、清除和控制贡献了新的思路,同时为食源性致病菌的风险评估提供了理论支持,进一步为食品安全和人体健康领域提供了重要的数据基础和实验依据,对于相关领域的研究和实践具有一定的指导意义和应用前景。

作者声明本文无利益冲突。

参考文献:

- [1] 古小莉,徐瑞文,李惠青,等.广东沿海养殖牡蛎中副溶血性弧菌的污染状况、毒力基因及耐药性分析[J].海洋环境科学,2022,41(6): 865-871.
GU X L, XU R W, LI H Q, et al. Analysis of contamination, virulence genes and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in cultured oysters from the coast in Guangdong province [J]. Marine Environmental Science, 2022, 41(6): 865-871.
- [2] CHEN H H, DONG S L, YAN Y, et al. Prevalence and population analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from freshwater fish in Zhejiang Province, China [J].

- Foodborne Pathogens and Disease, 2021, 18(2) : 139-146.
- [3] LEI T, JIANG F F, HE M, et al. Prevalence, virulence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of fluoroquinolone resistance of *Vibrio parahaemolyticus* from different types of food samples in China [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 317: 108461.
- [4] TENG L, ZOU G, ZHOU Y, et al. Phage controlling method against novel freshwater-derived *Vibrio parahaemolyticus* in ready-to-eat crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. Food Research International, 2022, 162: 111986.
- [5] O'BOYLE N, BOYD A. Manipulation of intestinal epithelial cell function by the cell contact-dependent type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2014, 3: 114.
- [6] ZHANG L L, KRACHLER A M, BROBERG C A, et al. Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species [J]. Cell Reports, 2012, 1(5): 453-460.
- [7] BROBERG C A, CALDER T J, ORTH K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants [J]. Microbes and Infection, 2011, 13(12/13): 992-1001.
- [8] CECCARELLI D, HASAN N A, HUQ A, et al. Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2013, 3: 97.
- [9] RITCHIE J M, RUI H P, ZHOU X H, et al. Inflammation and disintegration of intestinal villi in an experimental model for *Vibrio parahaemolyticus*-induced diarrhea [J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(3): e1002593.
- [10] HIYOSHI H, KODAMA T, IIDA T, et al. Contribution of *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors to cytotoxicity, enterotoxicity, and lethality in mice [J]. Infection and Immunity, 2010, 78(4): 1772-1780.
- [11] MATZ C, NOURI B, MCCARTER L, et al. Acquired type III secretion system determines environmental fitness of epidemic *Vibrio parahaemolyticus* in the interaction with bacterivorous protists [J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20275.
- [12] IZUTSU K, KUROKAWA K, TASHIRO K, et al. Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains [J]. Infection and Immunity, 2008, 76(3): 1016-1023.
- [13] RIVERA-CANCEL G, ORTH K. Biochemical basis for activation of virulence genes by bile salts in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Gut Microbes, 2017, 8(4): 366-373.
- [14] GOTOH K, KODAMA T, HIYOSHI H, et al. Bile acid-induced virulence gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* reveals a novel therapeutic potential for bile acid sequestrants [J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13365.
- [15] YILDIZ F H, VISICK K L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different [J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(3): 109-118.
- [16] STEWART B J, MCCARTER L L. Lateral flagellar gene system of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(15): 4508-4518.
- [17] BROWN H L, HANMAN K, REUTER M, et al. *Campylobacter jejuni* biofilms contain extracellular DNA and are sensitive to DNase I treatment [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 699.
- [18] OPHIR T, GUTNICK D L. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(2): 740-745.
- [19] COLVIN K M, GORDON V D, MURAKAMI K, et al. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Plos Pathogens, 2011, 7(1): e1001264.
- [20] CUGINI C, SHANMUGAM M, LANDGE N, et al. The role of exopolysaccharides in oral biofilms [J]. Journal of Dental Research, 2019, 98(7): 739-745.
- [21] HOBLEY L, HARKINS C, MACPHEE C E, et al. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2015, 39(5): 649-669.
- [22] PARK J H, LEE B, JO Y, et al. Role of extracellular matrix protein CabA in resistance of *Vibrio vulnificus* biofilms to decontamination strategies [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 236: 123-129.
- [23] LI W, WANG J J, QIAN H, et al. Insights into the role of extracellular DNA and extracellular proteins in biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 813.
- [24] BOWLER P G. Antibiotic resistance and biofilm tolerance: a combined threat in the treatment of chronic infections [J]. Journal of Wound Care, 2018, 27(5): 273-277.
- [25] BERNBOM N, VOGEL B F, GRAM L. *Listeria monocytogenes* survival of UV-C radiation is enhanced by presence of sodium chloride, organic food material and by bacterial biofilm formation [J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 147(1): 69-73.
- [26] GUZMÁN-SOTO I, MCTIERNAN C, GONZALEZ-GOMEZ M, et al. Mimicking biofilm formation and

- development: recent progress in *in vitro* and *in vivo* biofilm models[J]. *Iscience*, 2021, 24(5): 102443.
- [27] AHMED H A, EL BAYOMI R M, HUSSEIN M A, et al. Molecular characterization, antibiotic resistance pattern and biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. cholerae* isolated from crustaceans and humans [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2018, 274: 31-37.
- [28] CHEN L, QIU Y, TANG H, et al. ToxR is required for biofilm formation and motility of *Vibrio Parahaemolyticus* [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2018, 31(11): 848-850.
- [29] PARIJS I, STEENACKERS H P. Competitive inter-species interactions underlie the increased antimicrobial tolerance in multispecies brewery biofilms[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(8): 2061-2075.
- [30] 王克波, 赵金山, 刘丹茹, 等. 2014-2016年山东省淡水产品中致病性弧菌的污染状况[J]. *现代预防医学*, 2017, 44(16): 2924-2927.
- WANG K B, ZHAO J S, LIU D R, et al. Pollution of pathogenic vibrio in fresh water products in Shandong Province between 2014 and 2016[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2017, 44(16): 2924-2927.
- [31] 裴晓燕, 余波, 张秀丽, 等. 中国内陆6省(自治区)淡水鱼养殖、销售和餐饮环节常见嗜盐性弧菌污染调查[J]. *中国食品卫生杂志*, 2016, 28(1): 79-83.
- PEI X Y, YU B, ZHANG X L, et al. Monitoring of halophilic *Vibrio* spp. from farming, salting and catering of freshwater fish in inland cities[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2016, 28(1): 79-83.
- [32] LIU B X, LIU H Q, PAN Y J, et al. Comparison of the effects of environmental parameters on the growth variability of *Vibrio parahaemolyticus* coupled with strain sources and genotypes analyses [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 994.
- [33] 赵伟. 胆盐胁迫下副溶血性弧菌的异质性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.
- ZHAO W. Study on the heterogeneity of *Vibrio parahaemolyticus* under bile salts stress [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022.
- [34] TAN L J, LI H H, CHEN B W, et al. Dual-species biofilms formation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Shewanella putrefaciens* and their tolerance to photodynamic inactivation [J]. *Food Control*, 2021, 125: 107983.
- [35] LI L, LU B B, FAN Q K, et al. Synthesis and self-assembly behavior of pH-responsive star-shaped POSS-(PCL-P(DMAEMA-*co*-PEGMA))₁₆ inorganic/organic hybrid block copolymer for the controlled intracellular delivery of doxorubicin [J]. *RSC Advances*, 2016, 6(66): 61630-61640.
- [36] TAN L, ZHAO F, HAN Q, et al. High correlation between structure development and chemical variation during biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1881.
- [37] 宋雪迎. 温度影响副溶血性弧菌生物被膜形成的初步机理研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- SONG X Y. Preliminary mechanism of temperature on biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.
- [38] 刘冰宣. 水产品中副溶血性弧菌生长异质性的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- LIU B X. On the study of the growth variability of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic product [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.
- [39] 王扬眉. 人工模拟胃液下副溶血性弧菌的生长异质性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2020.
- WANG Y M. Heterogeneity of *Vibrio parahaemolyticus* under artificial gastric fluids [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020.
- [40] 江春铃. 不同毒力基因型副溶血性弧菌混合生物被膜的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2023.
- JIANG C L. Research of mixed biofilms of *Vibrio parahaemolyticus* of different virulence genotypes [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2023.
- [41] CHEN B W, HUANG J M, LI H H, et al. Eradication of planktonic *Vibrio parahaemolyticus* and its sessile biofilm by curcumin-mediated photodynamic inactivation [J]. *Food Control*, 2020, 113: 107181.
- [42] LI Y F, TAN L, GUO L X, et al. Acidic electrolyzed water more effectively breaks down mature *Vibrio parahaemolyticus* biofilm than DNase I [J]. *Food Control*, 2020, 117: 107312.
- [43] SONG X Y, MA Y J, FU J J, et al. Effect of temperature on pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* biofilm formation [J]. *Food Control*, 2017, 73: 485-491.
- [44] SVENSSON S L, PRYJMA M, GAYNOR E C. Flagella-mediated adhesion and extracellular DNA release contribute to biofilm formation and stress tolerance of *Campylobacter jejuni* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e106063.
- [45] PROUTY A M, SCHWESINGER W H, GUNN J S. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp [J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(5): 2640-2649.
- [46] CHEN K M, CHIANG M K, WANG M L, et al. The role of *pgaC* in *Klebsiella pneumoniae* virulence and biofilm formation [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2014, 77: 89-99.
- [47] 董旭日, 柴旭锋, 檀玲, 等. 副溶血性弧菌-霍乱弧菌混合生物被膜形成过程研究[J]. *微生物学报*, 2018, 58

- (10): 1808-1816.
- DONG X R, CHAI X F, TAN L, et al. Dynamic biofilm forming process of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholera* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(10): 1808-1816.
- [48] DING X S, ZHAO B, AN Q, et al. Role of extracellular polymeric substances in biofilm formation by *Pseudomonas stutzeri* strain XL-2 [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103 (21/22) : 9169-9180.

Study on the heterogeneity of mixed biofilms of *Vibrio parahaemolyticus* with different virulence genotypes under bile salts stress

GU Xin¹, PAN Yingjie^{1,2,3}, ZHAO Yong^{1,2,3}, LIU Haiquan^{1,2,3,4}

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China; 3. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China; 4. Engineering Research Center of Food Thermal-processing Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: In this study, the characteristics of biofilm formation of single and mixed strains of *Vibrio parahaemolyticus* with different virulence genotypes from freshwater products under pure culture conditions and bile salts stress were investigated. The amount of biofilm formation and cell viability were detected by crystal violet staining and CCK-8 method, and the structure of biofilm was visually observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Bicinchoninic acid (BCA) method and phenol-sulfuric acid method were used to quantitatively analyze the contents of extracellular protein and extracellular polysaccharide before and after bile salts treatment. The results showed that bile salts treatment inhibited the formation of *V. parahaemolyticus* biofilm, significantly decreased the amount of biofilm formation and cell viability, and affected the degree of aggregation and disorganization of biofilm system, and disrupted the biofilm structure, while affecting the synthesis and secretion of extracellular protein and extracellular polysaccharide. Strains containing *tdh* gene can form more and more stable biofilms, and the mixed strains showed greater adaptability to bile salts stimulation and were able to respond rapidly to counteract this stress, thus ensuring more stable survival of the strains. This study provides a new theoretical support for the formation and control of *V. parahaemolyticus* mixed biofilms, which is of great significance for exploring the impact of *V. parahaemolyticus* carriage in freshwater products on food safety and human health, and provides an important reference for further research on its adaptive mechanism and prevention and control in the human gut.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; bile salts stress; mixed biofilms; freshwater product source