

哈维氏弧菌生物被膜体外模型的建立及成膜特性研究

李海平¹, 鄢庆枇¹, 徐晓津¹, 苏永全², 覃映雪¹

1. 集美大学水产学院, 福建省高校水产科技与食品安全重点实验室, 福建 厦门 361021; 2. 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005

摘要: 采用改良微孔板法建立哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* TS-628 菌株生物被膜体外模型, 并进一步研究环境因子对哈维氏弧菌体外形成生物被膜的影响。结果发现, 哈维氏弧菌 TS-628 菌株可以在聚苯乙烯板中形成生物被膜, 并且该菌生物被膜的形成受起始菌液浓度、温度、pH 等理化因子的显著影响。温度为 30℃、NaCl 质量分数为 3%—6%、pH 为 7、孵育时间为 36h 是哈维氏弧菌形成生物被膜的最佳条件。此外哈维氏弧菌在分别经表皮黏液、鳃黏液、肠道黏液、肝脏提取液、脾脏提取液、肌肉提取液包被的基质上成膜效果显著, 其中在经肝脏提取液包被的基质上形成的生物被膜量显著高于在其他生物基质上形成的生物被膜量($p < 0.01$)。

关键词: 哈维氏弧菌; 生物被膜; 环境因子; 微孔板法; 生物基质

中图分类号: P735.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-5470(2011)03-0099-06

Establishment of in vitro biofilm model and characteristics of biofilm formation of *Vibrio harveyi*

LI Hai-ping¹, YAN Qing-pi¹, XU Xiao-jin¹, SU Yong-quan², QIN Ying-xue¹

1. Fisheries College of Jimei University, Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Xiamen 361021, China; 2. College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract: Modified microtiter-plate test was used to establish an in vitro biofilm model of *Vibrio harveyi* TS-628 strain. Effect of environmental factors on bacterial biofilm formation in vitro was also studied. The results show that *V. harveyi* TS-628 strains could form biofilm in polystyrene plates, and biofilm formation of this bacterium was significantly affected by different environmental factors, such as temperature, initial bacterial concentration, pH, NaCl concentration, and so on. The optimum conditions for biofilm formation of *V. harveyi* TS-628 strain are at temperature of 30℃, pH=7, NaCl concentration of 3%—6%, and using 36h incubation time. Furthermore, *V. harveyi* TS-628 strain could form biofilm on the walls coated with skin mucus, gill mucus, intestinal mucus, liver extract, spleen extract, and muscle extract. The biofilm formation of *V. harveyi* on the walls coated with liver extract exhibited a remarkably higher value of $D(590)$ ($p < 0.01$) than that on the walls coated with other tissue extracts.

Key words: *Vibrio harveyi*; biofilm; environmental factor; microtiter-plate test; biological matrix

生物被膜是细菌间相互协调形成的高度分化的结构群体, 其外包裹着自身产生的多聚基质, 有利于细菌抵抗外界不利因素^[1-2]。作为自然界中细菌主要的生存方式, 生物被膜可抵御宿主免疫系统和抗菌药物杀伤作用, 从而产生对抗菌药物的高度耐药性(可达到浮游状态的 10—1000 倍), 导致感染难以

消除, 给人类的生产生活带来了严重危害^[3]。大约 65% 人类细菌性感染是由生物被膜细菌引起的, 甚至在细菌侵染植物和真菌的过程中, 也有生物被膜的参与^[4]。鉴于生物被膜在临床治疗及环境、工业生产等方面的危害, 揭示生物被膜的形成条件具有十分重要的现实意义。

收稿日期: 2010-06-29; 修订日期: 2011-03-28。蔡卓平编辑

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2007AA09Z115)

作者简介: 李海平(1985—), 男, 福建省厦门市人, 硕士研究生, 主要从事水产微生物研究。

通信作者: 覃映雪。E-mail: yxqin@jmu.edu.cn

哈维氏弧菌 *Vibrio harveyi* 广泛分布于近岸温暖的海水、海洋沉积物、海洋动物体表、海洋发光鱼类和头足类动物等各种海洋场所^[5]。哈维氏弧菌是一种革兰氏阴性、发光的(并非所有菌株)海洋细菌,菌体呈弧状,极生单鞭毛,是海水鱼虾养殖中常见的致病菌,其引起的大范围疾病曾给养殖业造成巨大的经济损失^[6-8]。哈维氏弧菌的致病机理还未明了,引起的弧菌病也还没有有效的防治措施。目前有关弧菌的研究主要是针对其游离态,而对其另外一种重要生存方式“生物被膜”的研究目前还鲜有报道。有关哈维氏弧菌生物被膜的研究目前仅见 Karunasagar 等^[9]报道的其在不同非生物基质表面上形成生物被膜的情况,而关于哈维氏弧菌生物被膜其他方面的研究还未见报道。以从患病青石斑鱼 *Epinephelus awoara* 分离到的病原菌哈维氏弧菌 TS-628 菌株为研究对象,建立该菌生物被膜的体外模型,探讨理化及生物因子对哈维氏弧菌生物被膜形成的影响,了解该菌生物被膜形成的规律,为进一步探索该菌的致病机理及防治措施奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 菌株及培养条件

哈维氏弧菌 TS-628 菌株为从患病青石斑鱼病灶分离的病原菌^[10],保存于本实验室的-80 超低温冰箱。哈维氏弧菌接种于质量分数为 2%的 NaCl 胰蛋白胨大豆培养液 (TSB), 30 培养 10h, 4000r·min⁻¹ 离心 10min 收集菌体,用质量分数为 0.85%的无菌生理盐水清洗 2 次,然后用无菌生理盐水将菌浓度调整到 10⁸cfu·mL⁻¹ 左右待用。

1.2 生物被膜的形成及测定

细菌生物被膜的形成与定量测定参考 Pratt 等^[11]的方法并进行适当改进,具体步骤如下。在无菌 96 孔聚苯乙烯板中每孔加入 TSB 培养液 150μL,再加入菌悬液 50μL。将孔板放置于湿盒,30 孵育 16h,实验过程中每组做 6 个平行孔,以无菌培养基孔作为空白对照。缓慢吸出孔内菌悬液,生理盐水洗孔 3 次去除游离细菌,将聚苯乙烯孔板于 60 干燥固定 30min。每孔加入质量分数为 0.1%的结晶紫 200μL,放置 10min 后吸出染液,生理盐水洗孔 3 次去除染液,干燥。每孔加入体积分数为 33%的乙酸 200μL,充分溶解结晶紫后,利用酶标仪测定 590nm 波长的光密度 $D(590)$ 。

1.3 不同培养时间对哈维氏弧菌成膜的影响

孵育时间分别设为 0、2、4、6、8、10、12、16、20、24、36、48 和 60h,其余步骤按上述的改进方法进行。

1.4 不同菌浓度对哈维氏弧菌成膜的影响

加入 96 孔板的菌悬液的浓度分别调整为 2×10^2 、 2×10^3 、 2×10^4 、 2×10^5 、 2×10^6 、 2×10^7 、 2×10^8 、 2×10^9 cfu·mL⁻¹,其余步骤按上述的改进方法进行。

1.5 不同温度对哈维氏弧菌成膜的影响

将孵育温度分别设定为 4、10、15、20、25、30、35 和 40 ,将湿盒分别置于上述不同温度下预温 30min,其余步骤按上述的改进方法进行。

1.6 初始 pH 对哈维氏弧菌成膜的影响

配制 pH 分别为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的 TSB 培养基,然后再以这些培养基制备相应的菌悬液加入 96 孔板中进行成膜培养,其余步骤按上述的改进方法进行。

1.7 不同 NaCl 浓度对哈维氏弧菌成膜的影响

分别配制含不同 NaCl 浓度的 TSB,使得加入 96 孔板菌悬液的 NaCl 质量分数分别为 0、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%和 8%,以去离子水制备菌液进行无离子状态实验,其余步骤按上述的改进方法进行。

1.8 不同生物基质对哈维氏弧菌成膜的影响

1.8.1 黏液与组织提取液的制备

参考 Chen 等^[12]制备大黄鱼 *Pseudosciaena crocea* 表皮黏液、腮黏液与肠黏液的方法制备青石斑鱼的表皮黏液、腮黏液与肠黏液。剪取青石斑鱼肌肉、脾脏和肝脏组织块,剪碎后放入无菌 PBS 中匀浆(pH 为 7.2)。将粗制的黏液和组织匀浆液分别于 4 、14593r·min⁻¹ 离心 2 次,每次 30min,取上清液,依次用 0.45 和 0.22μm 的微孔滤膜过滤除菌。根据 Bradford^[13]的方法将蛋白含量调整到 1mg·mL⁻¹ 后保存于 4 冰箱待用。

1.8.2 哈维氏弧菌在青石斑鱼黏液与组织液中的体外成膜实验

将上述制备的青石斑鱼的黏液和组织提取液以每孔 200μL 的量分别加入 96 孔酶标板中,4 包被 24h 后弃去未结合黏液和提取液,用无菌生理盐水清洗 2 次。按上述改进方法测定哈维氏弧菌在不同基质上形成生物被膜的情况,以未经包被的酶标板作为阴性对照。

1.9 数据处理

结果以平均数与标准差表示, 用 Excel 和 SPSS 等软件进行数据统计学分析。

2 结果与分析

2.1 孵育时间对哈维氏弧菌成膜的影响

哈维氏弧菌在聚苯乙烯孔板中的成膜量先随着孵育时间的延长而增加。孵育时间在 36h 时 $D(590)$ 值显著地高于其他实验组的 $D(590)$ 值 ($p < 0.01$), 即形成的生物被膜量最大; 随后 $D(590)$ 值呈现缓慢下降的趋势, 2h 的 $D(590)$ 值极显著地低于其他孵育时间的检测值 ($p < 0.01$) (图 1)。

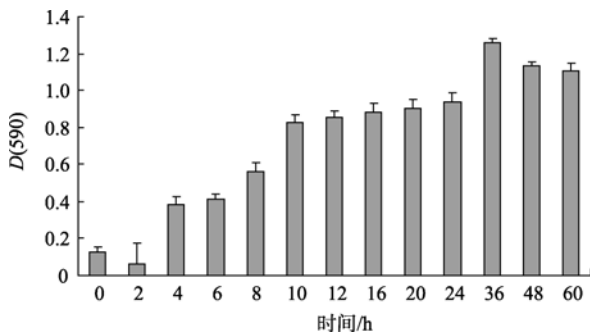


图 1 孵育时间对哈维氏弧菌成膜的影响

Fig. 1 Influence of incubation time on biofilm formation of *V. harveyi*

2.2 初始菌浓度对哈维氏弧菌成膜情况的影响

当初始菌浓度在 2.0×10^2 — 2.0×10^7 cfu·mL⁻¹ 时, 哈维氏弧菌形成的生物被膜量较低且各组数据间没有显著差异。当初始菌浓度达到 2.0×10^8 和 2.0×10^9 cfu·mL⁻¹ 时, 细菌成膜量显著增加, 与其他初始菌浓度下的成膜量相比存在极显著的差异 ($p < 0.01$) (图 2)。

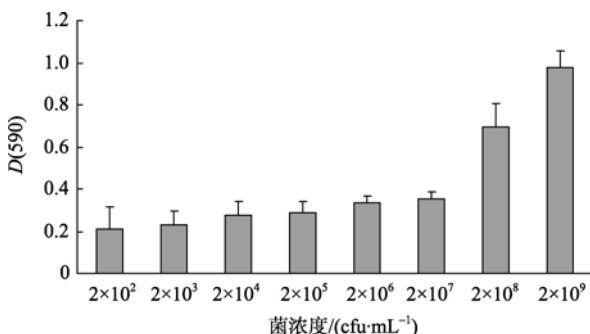


图 2 初始菌浓度对哈维氏弧菌成膜的影响

Fig. 2 Influence of bacterial original concentration on biofilm formation of *V. harveyi*

2.3 培养温度对哈维氏弧菌成膜的影响

温度对哈维氏弧菌成膜作用的影响结果见图 3。

温度在 4—15 时, 生物被膜量维持在一个很低的水平, 几乎不生成生物被膜; 温度达到 20 时细菌生物被膜开始形成; 30 时生物被膜的量达到峰值并与其他温度下形成的生物被膜的量均存在极显著性差异 ($p < 0.01$); 当温度升高至 35 时, 生物被膜形成受到抑制, 随着温度进一步升高至 40 时, 生物被膜的量急剧下降。

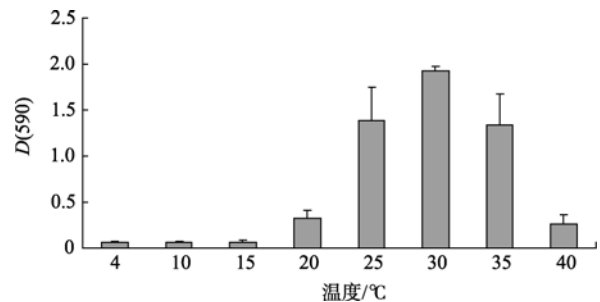


图 3 培养温度对哈维氏弧菌成膜的影响

Fig. 3 Influence of incubation temperature on biofilm formation of *V. harveyi*

2.4 初始 pH 对哈维氏弧菌成膜的影响

pH 对哈维氏弧菌成膜作用的影响结果见图 4。

在 pH 为 6—7.5 时, 生物被膜形成明显; 在 pH 为 7 时形成的生物被膜量达到最大, 并与其他 pH 下形成的生物被膜的量有极显著差异 ($p < 0.01$)。而在 pH 大于 8 或小于 6 时形成的生物被膜受到抑制, 且碱性条件对生物被膜形成的影响更为显著。

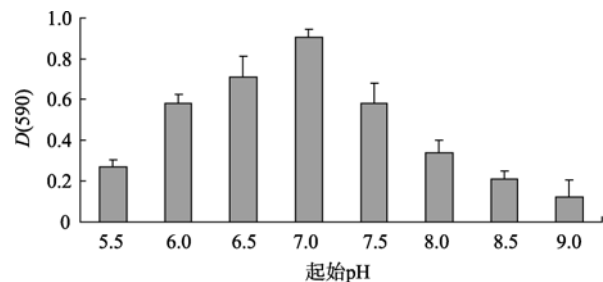


图 4 初始 pH 对哈维氏弧菌成膜的影响

Fig. 4 Influence of original pH on biofilm formation of *V. harveyi*

2.5 不同 NaCl 浓度对哈维氏弧菌成膜的影响

NaCl 浓度对哈维氏弧菌成膜作用的影响结果见图 5。NaCl 浓度在 1%—5% 时哈维氏弧菌的成膜量逐步增加, 且 NaCl 浓度在 5% 时成膜量最大, 极显著地高于其他 NaCl 浓度下形成的生物被膜量 ($p < 0.01$)。NaCl 浓度大于 5% 时的成膜量呈下降的趋势, NaCl 浓度在 0 和 8% 时哈维氏弧菌几乎不能形成生物被膜。

2.6 哈维氏弧菌在不同基质上的成膜情况

哈维氏弧菌在分别经表皮黏液、鳃黏液、肠道

黏液、肝脏提取液、脾脏提取液、肌肉提取液包被基质上的成膜量极显著地高于对照组($p < 0.01$)。细菌在经肝脏提取液包被基质上形成的生物被膜量极显著地高于在其他生物基质上形成的生物被膜量($p < 0.01$)(图 6)。

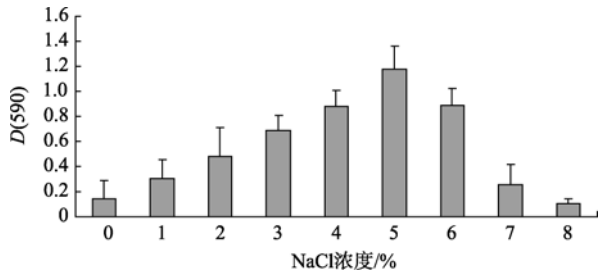


图 5 不同浓度 NaCl 对哈维氏弧菌成膜的影响

Fig. 5 Influence of NaCl concentration on biofilm formation of *V. harveyi*

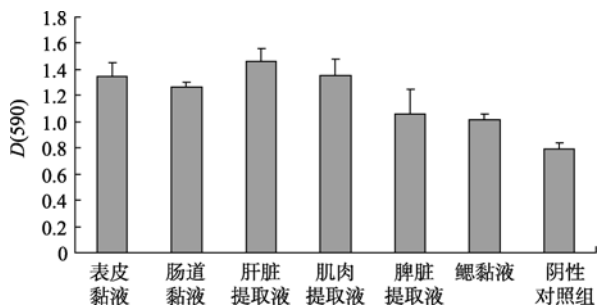


图 6 哈维氏弧菌在不同基质上的成膜情况

Fig. 6 Results of biofilm formation of *V. harveyi* on different matrix

3 讨论

从实验结果上看, 哈维氏弧菌 TS-628 菌株可以形成生物被膜, 而且该菌生物被膜的形成是一个由起始到逐步成熟、稳定再到逐步衰退的动态过程。前人的研究也发现, 细菌生物被膜的形成是一个动态过程, 包括可逆性黏附、不可逆性黏附、微菌落形成、生物被膜成熟和解聚等阶段, 在各阶段具有不同的生理生化特性^[14]。起始阶段也是细菌对基质的黏附阶段, 成熟过程则是细菌生长繁殖形成微菌落及包外多聚物的过程^[15]。而衰退过程有学者认为是成熟的生物被膜内细菌会出现异化、死亡或生物被膜基质成分被分解, 从而导致生物被膜结构崩解和生命的消亡^[16]; 也有学者认为是成熟的生物被膜在内在调节机制或外部冲刷力等作用下可部分脱落, 脱落的细菌又转变成浮游生长状态的缘故^[17]。还有研究发现这一过程在球形红细菌 *Rhodobacter*

sphaeroides 生物被膜中是受密度感应系统的群体逃离反应介导的^[18]。

本研究还发现哈维氏弧菌生物被膜的形成量与菌液的起始浓度相关, 菌液起始浓度达到 $2.0 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上时更容易形成大量生物被膜。陈强等^[19]的研究也表明细菌的黏附量与菌浓度成正比, 而黏附被认为是细菌在基质上成膜的第一步, 说明细菌起始浓度高有利于在基质上的黏附, 进而有利于生物被膜的形成。已有研究还发现生物被膜形成是一个较为复杂的过程, 该过程受外界环境, 如营养成分、pH 值、温度、渗透压、水流冲刷力、介质的表面特性及铁离子浓度和氧化还原电位等, 以及菌体自身如膜表面特性、凝固酶的有无、染色体的倍性(面包酵母染色体倍数越低越易形成膜)等条件的影响^[20]。温度作为微生物生长过程中的一个重要影响因素, 在哈维氏弧菌的生物被膜生成过程中起着重要的作用。本研究中哈维氏弧菌 TS-628 菌株的最适成膜温度在 25—35 之间, 与该菌的最适生长温度相近, 说明利于该菌生长的温度也利于形成生物被膜。渗透压对生物被膜的形成产生重要影响^[20]。本实验中 NaCl 浓度在 0 时几乎不成膜, 鄢庆彬等^[21]的实验结果也发现当 NaCl 浓度为 0 的时候 *V. alginolyticus* 基本没有黏附。黏附是细菌成膜的第一步, 无法黏附于基质上, 细菌也就难以形成生物被膜。当 NaCl 浓度过高时, 细菌形成生物被膜受到抑制, 原因可能是渗透压过高, 细菌受到来自环境的生存压力较大, 生长受到影响, 进而影响生物被膜的形成。本研究中哈维氏弧菌在 pH 为 5.5—7 时的成膜量逐渐增加, pH 为 7 时的成膜量最大, 弱酸性至中性条件下的成膜量明显大于碱性条件下的成膜量。Balebona 等^[22]研究表明鳃弧菌 *Vibrio anguillarum* 对表皮黏液的黏附作用在酸性环境时要比中性环境时强。pH 为弱酸性到中性时溶藻弧菌对前、后肠黏液的黏附作用较强, 在 pH 为 6 时最强, 而在偏碱性环境下黏附作用明显下降, 黏附作用的强弱直接影响了成膜的效果^[23], 这都与本研究结果相符合。

本研究还发现哈维氏弧菌在青石斑鱼体表黏液、肠道黏液、肝脏提取液、肌肉提取液、脾脏提取液、鳃黏液等不同部位组织提取液上的成膜效果比在聚苯乙烯板上的好, 可能是由于黏液和组织提取物中所含的蛋白质和糖分促进了生物被膜的形成。Sutherland^[24]的研究也发现糖和蛋白质在生物被

膜的形成过程中发挥着重要的作用。哈维氏弧菌形成生物被膜的最佳条件与该菌的最适生长条件基本一致, 有利于哈维氏弧菌生长的条件也有利于生物被膜的形成。但并非所有细菌都遵循这一规律, 对某些微生物而言, 不利的环境压力下反而会促进生物被膜的形成, 因为细菌以群体方式生活的目的也是为了躲避捕食者并增强对有毒药物的抗性以及消除其他外在危险^[25]。例如有研究发现, 一些海洋细菌生活在贫营养环境下时, 它们更容易形成生物被膜, 以便增加获取营养的渠道、减少废物排放、增强对有毒物质和抗生素的抗性及抵御捕食者的吞食等^[26]。

4 小结

1) 哈维氏弧菌 TS-628 菌株可以在聚苯乙烯板中形成生物被膜, 并且该菌生物被膜的形成受起始菌液浓度、温度、pH 等理化因子的影响。

2) 温度为 30 ℃、NaCl 质量分数为 3%—6%、pH 为 7、孵育时间为 36h 是哈维氏弧菌形成生物被膜的最佳条件。

3) 哈维氏弧菌在分别经表皮黏液、鳃黏液、肠道黏液、肝脏提取液、脾脏提取液、肌肉提取液包被的基质上的成膜效果显著, 其中在经肝脏提取液包被的基质上形成的生物被膜量显著高于在其他生物基质上形成的生物被膜量($p < 0.01$)。

参考文献

- [1] COSTERTON J W, CHENG K J, GEESEY G G, et al. Bacterial biofilms in nature and disease[J]. Annual Review in Microbiology, 1987, 41: 435–464.
- [2] COSTERTON J W, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL D E, et al. Microbial biofilms[J]. Annual Review in Microbiology, 1995, 49: 711–745.
- [3] BORRIELLO G, WERNER E, ROE F, et al. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48 (7): 2659–2664.
- [4] CHICUREL M. Bacterial biofilms and infections. Slime-busters[J]. Nature, 2000, 408: 284–286.
- [5] ORNDORFF S A, COLWELL R R. Distribution and identification of luminous bacteria from the Sargasso Sea[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1980, 39(5): 983–987.
- [6] SUNARYANTO A, MARIAM A. Occurrence of a pathogenic bacteria causing luminescence in penaeid larvae in Indonesian hatcheries[J]. Bull Brackishwat Aquacult Dev Cent, 1986, 8: 105–112 .
- [7] AUSTIN B, AUSTIN D A. Bacterial Fish Pathogens: Diseases of Farmed and Wild Fish[M]. 3rd ed. Godalming: Springer-Praxis, 1999: 40–44.
- [8] ZHANG X H, AUSTIN B. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids[J]. J Fish Dis, 2000, 23: 93–102 .
- [9] KARUNASAGAR I, KARUNASAGAR I. Vaccines and immunostimulants for sustainable aquaculture[M]// KARUNASAGAR I, KARUNASAGAR I, REILLY A. Aquaculture and biotechnology. Enfield, NH, USA: Science Publishers, 1999: 33–46.
- [10] 覃映雪, 池信才, 苏永全, 等. 网箱养殖青石斑鱼的溃疡病病原[J]. 水产学报, 2004, 28(3): 297–302.
- [11] PRATT L A, KOLTER R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili[J]. Molecular Microbiology, 1998, 30 (2): 285–293.
- [12] CHEN QIANG, YAN QINGPI, WANG KEJUAN, et al. The portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into *Pseudosciaena crocea* and characteristic of the bacterial adhesion to the mucus[J]. Disease of Aquatic Organism, 2008, 80: 181–188.
- [13] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [14] SAUER K, CAMPER A K, EHRlich G D, et al. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184 (4): 1140–1154.
- [15] CHANDRA J, KUHN D M, MUKHERJEE P K, et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(18): 5385–5394.
- [16] WEBB J S, GIVSKOV M, KJELLEBERG S. Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity[J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6(6): 578–585.
- [17] SIMOES M, PEREIRA M O, VIEIRA M J. Action of a cationic surfactant on the activity and removal of bacterial biofilms formed under different flow regimes[J]. Water Research, 2005, 39(2/3): 478–486.
- [18] NAGAOKA H. Mass transfer mechanism in biofilms under oscillatory flow conditions[J]. Water Science and Technology, 1997, 36 (1): 329–336.
- [19] 陈强, 鄢庆彬, 邹文政, 等. 环境因子对溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)粘附大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)表皮粘液影响的研究[J]. 海洋与湖沼, 2007, 38(4): 361–366.
- [20] REYNOLDS T B, FINK G R. Bakers' yeast, a model for fungal biofilm formation[J]. Science, 2001, 291:

- 878-881.
- [21] 鄢庆枇, 陈强, 马甦, 等. 病原性溶藻弧菌对大黄鱼鳃黏液黏附作用研究[J]. 海洋学报, 2007, 29(6): 80-86.
- [22] BALEBONA M C, MORINIGO M A, FARIS A, et al. Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus[J]. Aquaculture, 1995, 132(1/2): 113-120.
- [23] YAN QINGPI, CHEN QIANG, MA SHEN, et al. Characteristics of adherence of pathogenic *Vibrio alginolyticus* to the intestinal mucus of large yellow croakers (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Aquaculture, 2007, 269(1/4): 21-30.
- [24] SUTHERLAND I W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework[J]. Microbiology, 2001, 14(1): 3-9.
- [25] JOHNSON L R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria[J]. Journal of Theoretical Biology, 2008, 251(1): 24-34.
- [26] LEE J W, NAM J H, KIM Y H, et al. Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces[J]. The Journal of Microbiology, 2008, 46(2): 174-182.