

# 致病性副溶血弧菌生物膜形成特性研究

陈珍<sup>1</sup>, 覃映雪<sup>1</sup>, 邹文政<sup>1</sup>, 徐晓津<sup>1</sup>, 邢颜丽<sup>1</sup>, 鄢庆枇<sup>1\*</sup>

(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)

**摘要:** 采用改良的微孔板法测定了 12 株弧菌的形成生物膜的效果, 选择形成生物膜效果最好的副溶血弧菌 ND-02, 进一步研究了环境因子对其生物膜形成的影响。实验结果显示副溶血弧菌 ND-02 菌株在静置培养 24~36 h 后形成成熟的生物膜, 在起始菌浓度为  $10^7 \sim 10^8$  CFU/mL 形成生物膜的量最大; 在 30 °C, NaCl 浓度为 3% ~ 5%, pH 偏弱碱性时的生物膜  $OD_{590}$  值最大;  $Ca^{2+}$  促进副溶血弧菌生物膜的形成, 而  $Mg^{2+}$  抑制生物膜的形成; 副溶血弧菌在分别经大黄鱼表皮黏液、肠黏液和肝脏提取液包被的的基质上形成生物膜的作用明显, 鳃黏液和脾脏提取液中次之, 肌肉提取液包被后生物膜形成量最低。以上结果表明, 副溶血弧菌 ND-02 菌株能形成稳定而明显的生物膜, 而且生物膜的形成受温度、NaCl 浓度、pH 值等环境因子的影响。

**关键词:** 副溶血弧菌; 生物膜; 环境因子

中图分类号: R378.3

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2010)05-0110-07

## 1 引言

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种嗜盐性革兰氏阴性菌, 广泛分布于养殖海域中, 是海水养殖中的一种重要条件致病菌<sup>[1]</sup>, 能引起鱼、虾、蟹和贝类等多种养殖动物的疾病<sup>[2]</sup>, 给水产养殖业造成严重的经济损失。此外, 副溶血弧菌还通过食物污染, 对人类健康造成严重危害<sup>[3]</sup>。由于副溶血弧菌是重要的人鱼共患病原之一, 所以其致病机理引起了有关研究者的关注, 对其生态<sup>[4]</sup>、黏附<sup>[5]</sup>以及感染性<sup>[3]</sup>等多方面进行了研究。

许多细菌能够附着于固体表面生长, 形成由细菌细胞和包裹着细菌的基质所组成的结构性细菌群落, 称为生物膜 (biofilm)<sup>[6]</sup>。生物膜中的细菌对抗生素的抗性很强且生物膜的胞外基质成分还能有效抑制免疫细胞的吞噬作用<sup>[7]</sup>, 不仅如此, 生物膜还能通过释放膜内细菌而导致再次感染, 所以由致病菌形成的生物膜给疾病的治疗带来很大困难<sup>[8]</sup>。据估

计, 65% 人类细菌性感染是由形成生物膜的细菌引起的<sup>[9]</sup>, 而通过对细菌生物膜的研究, 可望找到有效途径来控制细菌的相关感染, 因此生物膜已经成为当今医学微生物学的一个研究热点, 已对霍乱弧菌等致病性弧菌的生物膜方面进行了许多研究<sup>[10]</sup>。但目前尚无关于副溶血弧菌生物膜形成特性的研究报道。

本文从不同环境条件对副溶血弧菌形成生物膜影响的方面进行研究, 探索副溶血弧菌生物膜形成的规律, 以为揭示副溶血弧菌的致病机理和探索疾病防治技术提供理论依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 菌株及培养条件

副溶血弧菌 ND-02 分离自患病大黄鱼<sup>[11]</sup>, 保存于本实验室的 -80 °C 超低温冰箱。

溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*, As. 1. 1833)、副溶血弧菌 (As. 1. 1614)、河流弧菌 (*V. fluvial*, As.

收稿日期: 2010-01-17; 修订日期: 2010-05-06。

基金项目: 国家“八六三”计划项目 (2007AA09Z115); 厦门市科技项目 (3502Z20073019; 3502Z20073020)。

作者简介: 陈珍 (1986—), 女, 湖北省黄冈市人, 硕士研究生, 主要从事水产病害研究。E-mail: chenzhenhbnu@163.com

\* 通信作者: 鄢庆枇, 教授, 从事水产病害研究, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

1.1608)购自中国科学院微生物研究所,鳃弧菌(*V. anguillarum*)由华东理工大学馈赠,7株其他弧菌(A-16,A-19,A-20,B-2,B-5,B-9和B-12)分离自厦门集美海区。

细菌接种于2%的NaCl胰蛋白胨大豆培养液(TSB)中,28℃,180 r/min培养10 h后4℃,4 000 r/min离心10 min收集菌体,用无菌生理盐水将菌浓度调整到 $10^8$  CFU/mL左右待用。

## 2.2 生物膜的形成与测定

细菌生物膜的形成与定量测定参考Pratt等<sup>[12]</sup>的方法,并进行适当改进,具体步骤如下:将菌悬液与TSB(2.4% NaCl)按1:3体积混匀后再按200 μL/孔加入到96孔酶标板中,每组12个平行样,以无菌TSB为空白对照。湿盒28℃静置培养24 h后弃去培养液,用生理盐水250 μL/孔清洗2次,60℃干燥固定30 min。将生物膜用0.1%结晶紫200 μL/孔染色5 min后弃去染液,用生理盐水250 μL/孔清洗3次,干燥后溶解于200 μL/孔的33%乙酸,用酶标仪测定 $OD_{590}$ 值。以此方法测定溶藻弧菌、副溶血弧菌(ND-02)、河流弧菌、鳃弧菌、副溶血弧菌(As. 1.1614)以及7株其他弧菌形成生物膜的 $OD_{590}$ 值。

## 2.3 孵育时间和菌浓度对副溶血弧菌生物膜形成的影响

将孵育时间设为0,4,6,8,10,12,16,20,24,36,48,60,72 h,按2.2节的方法测定不同孵育时间副溶血弧菌形成的生物膜的 $OD_{590}$ 值。

将副溶血弧菌起始浓度调至 $3.0 \times 10^9$  CFU/mL( $OD_{590}$ 约0.4),10倍系列稀释得到 $3.0 \times 10^8$  CFU/mL, $3.0 \times 10^7$  CFU/mL, $3.0 \times 10^6$  CFU/mL, $3.0 \times 10^5$  CFU/mL, $3.0 \times 10^4$  CFU/mL, $3.0 \times 10^3$  CFU/mL, $3.0 \times 10^2$  CFU/mL的菌液,按2.2节的方法测定各起始菌浓度所形成生物膜的 $OD_{590}$ 值。

## 2.4 不同理化因子对副溶血弧菌生物膜形成的影响

### 2.4.1 温度对生物膜形成的影响

将孵育温度设为4,10,15,20,25,30,35,40℃,按2.2节的方法进行试验,比较不同温度下的生物膜形成情况。

### 2.4.2 NaCl浓度对形成生物膜的影响

分别配制终浓度为0%,1.0%,2.0%,3.0%,4.0%,5.0%,6.0%,7.0%,8.0%,9.0%,10.0%,11.0% NaCl的TSB,按2.2节的方法进行试验,比较不同NaCl浓度下的生物膜形成情况。

### 2.4.3 pH对形成生物膜的影响

配制pH值分别为5,6,7,8,9,10的TSB,按2.2节的方法进行试验,比较不同起始pH值下的生物膜形成情况。

### 2.4.4 $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ 对形成生物膜的影响

分别制备含0%,0.25%,0.50%,1.0%,1.5%  $CaCl_2$ ,  $MgCl_2$ 的TSB,按2.2节的方法进行试验,比较 $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ 对生物膜形成的影响。

## 2.5 副溶血弧菌在不同基质上形成生物膜的情况

### 2.5.1 黏液与组织提取液的制备

参考Chen等<sup>[13]</sup>的方法分别制备大黄鱼表皮黏液、腮黏液与肠黏液。

剪取大黄鱼肌肉、脾脏和肝脏组织块,将它们剪碎后放入无菌PBS(pH 7.2)中匀浆。

将粗制的黏液和组织匀浆液分别于4℃,14 770 r/min离心2次,每次30 min,取上清液;再依次用0.45 μm,0.22 μm微孔滤膜过滤除菌。根据Bradford<sup>[14]</sup>法将蛋白含量调整到1 mg/mL后保存于4℃冰箱待用。

### 2.5.2 体外形成生物膜实验

将不同的黏液和提取液以200 μL/孔分别加入96孔酶标板中,4℃包被24 h后弃去未结合黏液和提取液,用无菌生理盐水清洗2次。按2.2节的方法测定副溶血弧菌在不同基质上的生物膜形成情况,以没有黏液或组织提取液包被的酶标板为阴性对照。

## 2.6 数据处理

结果以平均数加或减标准偏差表示,用EXCEL,SPSS软件进行统计学分析。

# 3 结果

## 3.1 不同细菌形成生物膜的情况

不同菌株在聚苯乙烯酶标板表面形成生物膜的能力各不相同,在12株测试菌株中形成生物膜能力最强的有副溶血弧菌(ND-02)、溶藻弧菌和鳃弧菌等3株,而河流弧菌等4株菌形成生物膜的能力很弱,甚至不能形成明显的生物膜,其余5株菌有一定的形成生物膜的能力(见图1)。

## 3.2 孵育时间及菌浓度与细菌形成生物膜的关系

副溶血弧菌生物膜的形成与孵育时间密切相关。在开始阶段,随着时间的延长, $OD_{590}$ 值逐渐增大,表明生物膜的量在逐渐增加,36 h时 $OD_{590}$ 值达

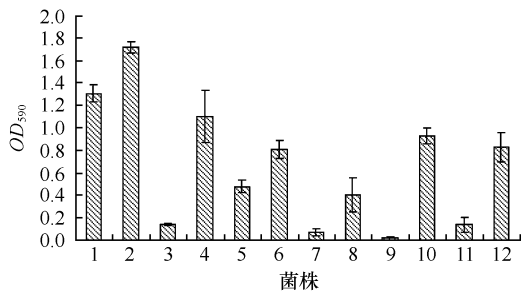


图1 不同菌株形成生物膜的情况

横坐标编号 1~12 依次代表溶藻弧菌、副溶血弧菌 (ND-02)、河流弧菌、鳗弧菌、副溶血弧菌 (As. 1. 1614)、弧菌 B-2、弧菌 B-5、弧菌 B-9、弧菌 B-12、弧菌 A-16、弧菌 A-19 和弧菌 A-20

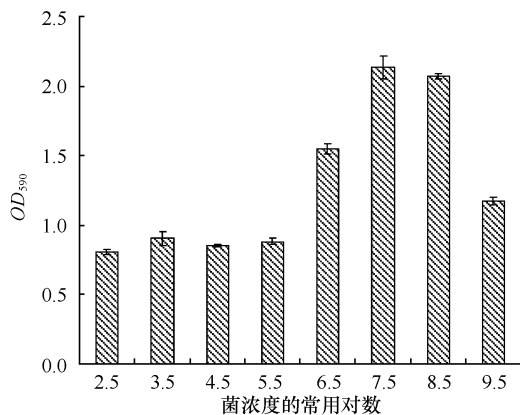


图3 菌浓度对副溶血弧菌形成生物膜的影响

到最大,极显著地高于其他孵育时间的检测值 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。

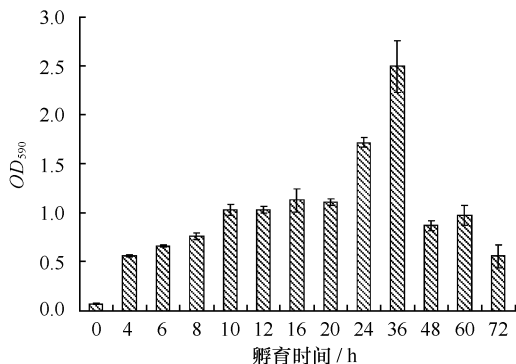


图2 孵育时间对副溶血弧菌形成生物膜的影响

副溶血弧菌起始菌浓度为  $3 \times 10^2 \sim 3 \times 10^5$  CFU/mL, 孵育 24h 后形成生物膜测得  $OD_{590}$  值较低, 而且无显著差异; 随着菌浓度的升高 ( $3 \times 10^5 \sim 3 \times 10^7$  CFU/mL),  $OD_{590}$  值极显著性增加 ( $P < 0.01$ );  $10^7$  CFU/mL 和  $10^8$  CFU/mL 实验组之间无显著差异; 菌浓度为  $10^9$  CFU/mL 实验组的  $OD_{590}$  值显著降低 (图 3)。

### 3.3 不同理化因子对副溶血弧菌形成生物膜的影响

副溶血弧菌生物膜的形成与温度密切相关, 在  $30^\circ\text{C}$  条件下副溶血弧菌所形成的生物膜的  $OD_{590}$  值最高, 极显著高于其他温度组的  $OD_{590}$  值 ( $P < 0.01$ )。副溶血弧菌在 20, 25,  $35^\circ\text{C}$  时形成的生物膜的  $OD_{590}$  值 (极) 显著高于  $4^\circ\text{C}$  与  $15^\circ\text{C}$  时生物膜的  $OD_{590}$  值, 在  $10^\circ\text{C}$  与  $40^\circ\text{C}$  条件下形成的生物膜的  $OD_{590}$  值最低, 极显著低于其他各温度组 (图 4)。

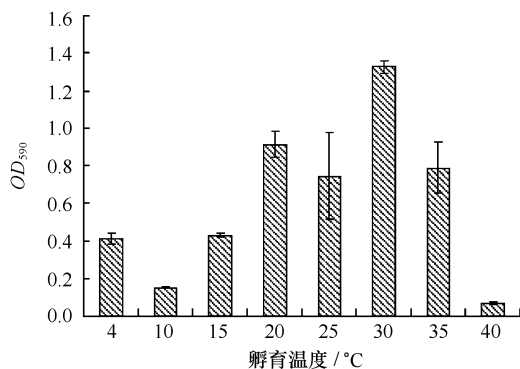


图4 孵育温度对副溶血弧菌形成生物膜的影响

图 5 显示 NaCl 浓度对副溶血弧菌生物膜的形成有显著影响, NaCl 浓度为 3%~5% 时, 副溶血弧菌形成的生物膜的  $OD_{590}$  值最高, NaCl 浓度为 2%, 4%~9% 时次之, NaCl 浓度为 0 与 1% 时  $OD_{590}$  值很低, 而 NaCl 为 10% 或 11% 时, 几乎不能形成生物膜。

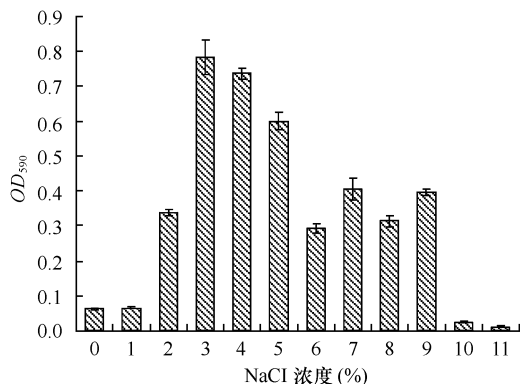


图5 不同浓度的 NaCl 对副溶血弧菌形成生物膜的影响

培养液起始 pH 为 4, 5, 6 时, 副溶血弧菌形成的生物膜  $OD_{590}$  值很低; pH 升到 7~10 的时候,  $OD_{590}$  随之显著增大 ( $P < 0.01$ ), 而且 pH 为 7 时  $OD_{590}$  值最大; pH 为 11 时, 不能形成生物膜。由此可见, 在中性偏弱碱性条件下, 最有利于副溶血弧菌生物膜的形成(图 6)。

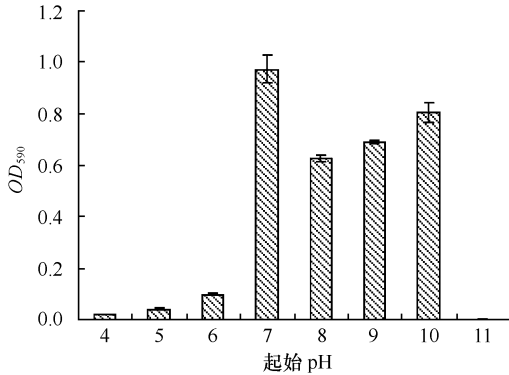


图 6 起始 pH 对副溶血弧菌形成生物膜的影响

$Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  对副溶血弧菌形成生物膜的影响如图 7 所示, 在添加  $Ca^{2+}$  的情况下, 副溶血弧菌形成的生物膜  $OD_{590}$  值比不添加  $Ca^{2+}$  的情况显著增大 ( $P < 0.05$ ), 并且在 0.5%~1.0% 的范围内, 形成的生物膜量随  $Ca^{2+}$  的增加而显著增加; 添加  $Mg^{2+}$  后副溶血弧菌生物膜形成量显著低于对照组, 0.50%~1.0% 的实验组之间结果无显著差异。

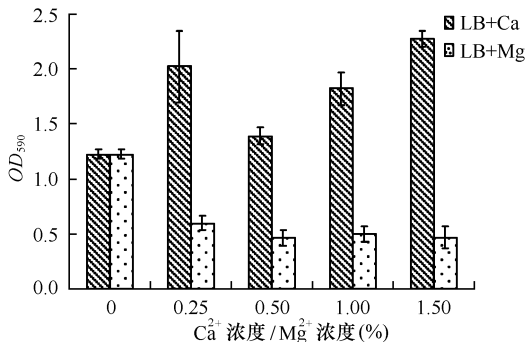


图 7  $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  浓度对副溶血弧菌形成生物膜的影响

### 3.4 副溶血弧菌在不同基质上形成生物膜的情况

副溶血弧菌在分别经表皮黏液, 鳃黏液, 肠黏液以及肝脏提取液包被的基质上形成的生物膜的  $OD_{590}$  值极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ); 经脾脏提取液包被的实验组  $OD_{590}$  与对照组无显著差异, 但经肌肉提取液包被后形成的生物膜的  $OD_{590}$  值显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 8)。

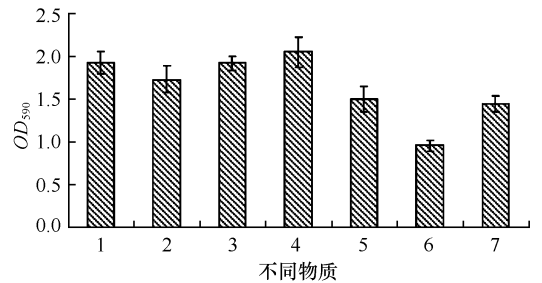


图 8 副溶血弧菌在不同基质上形成生物膜的情况  
横坐标编号 1~7 依次表示表皮黏液、鳃黏液、肠黏液、肝脏提取液、脾脏提取液、肌肉提取液以及阴性对照组

## 4 讨论

本文的研究结果表明并非所有的菌株都能形成稳定而明显的生物膜, 李京宝<sup>[15]</sup>的研究也发现大肠杆菌 (*Escherichia coli*) K-12 和霍乱弧菌 (*V. cholerae*) 的一些菌株在基础培养基条件下不能形成生物膜。Klausen 等<sup>[16]</sup>证明了细菌的生物膜与其毒力、生存能力相关。本文中副溶血弧菌 ND-02 菌株形成生物膜的能力最强, 这可能与其毒力有一定的关系。

Pratt 等<sup>[17]</sup>认为生物膜形成可以分为形成、成熟和衰老几个阶段。根据本文的结果, 副溶血弧菌 ND-02 菌株生物膜的形成也大致经历了这三个阶段, 其中 0~10 h 是形成期, 12~24 h 是稳定期, 48~72 h 是衰老期。生物膜之所以会进入衰老期, 主要是由于营养物质不断消耗, 细菌处于营养饥饿状态, 难以获得足够的用于合成代谢的原料, 致使细胞内大多数 RNA 和蛋白质的合成速率降低<sup>[18]</sup>, 而 Sutherland 等<sup>[19]</sup>认为一些蛋白是形成生物膜的物质基础。

Leah 等<sup>[20]</sup>认为细菌的黏附促进生物膜的形成, 细菌的黏附量会随着菌浓度的升高而增加, 因此较高的菌浓度有利于生物膜的形成, 这与本文结果类似。根据本文的结果, 细菌的黏附聚集只是形成生物膜的一个因素, 而黏附的细菌的繁殖才是生物膜中细菌的主要来源。细菌的黏附通常在数小时就能达到饱和<sup>[21]</sup>, 而生物膜的形成时间则要长得多, 这也说明细菌的繁殖在生物膜的形成中起重要作用。本文的研究结果发现, 过高的菌浓度反而不利于生物膜的形成, 这主要由于菌浓度过高会在短时下内耗竭营养物质, 细菌生长受抑制, 从而限制了生物膜的发育。

副溶血弧菌是嗜温性细菌,在 10~42℃内都能生长,最适生长温度为 31℃左右<sup>[4]</sup>。本文结果表明 25~35℃最适合副溶血弧菌生物膜的形成,这与副溶血弧菌适应的生长温度范围相吻合。副溶血弧菌在低温下(<15℃)生长迟缓,这可能是低温下生物膜发育缓慢的主要原因之一;40℃下副溶血弧菌虽然能维持生存,但几乎不能形成生物膜,这可能是胞外酶类物质对温度敏感的原因所致,另外 Ulitzur<sup>[22]</sup>认为高温抑制鞭毛的生成,而鞭毛的运动能促进生物膜形成。副溶血弧菌在稍高温下形成生物膜的特性也可从一个侧面说明为什么由副溶血弧菌引发的疾病多发生在水温较高的季节。10℃是副溶血弧菌最低生长温度,其在 4℃形成生物膜的量高于 10℃,这可能与副溶血弧菌在不同温度下的黏附能力等因素有关。鄢庆枇等<sup>[23]</sup>研究发现 4℃时溶藻弧菌对大黄鱼鳃黏液的黏附量高于 8℃的黏附量。

副溶血弧菌是嗜盐菌,能在 0.50%~9.5%的 NaCl 中生长<sup>[24]</sup>,最适 NaCl 范围为 3%~7%<sup>[4]</sup>。本文结果显示副溶血弧菌在 NaCl 浓度为 3%~5%时生物膜形成得最好,这与其 NaCl 浓度适应范围相吻合。Na<sup>+</sup>能够驱动海洋弧菌端鞭毛的运动<sup>[25]</sup>,而鞭毛的运动促进生物膜的形成<sup>[22]</sup>。当 NaCl 浓度超过 10%时,副溶血弧菌不能生长,故而几乎不能形成生物膜。

副溶血弧菌能在 pH 5~10 范围内生长且最适生长 pH 为 7~9<sup>[26]</sup>,本实验显示 pH 7~10 时该菌最易形成生物膜,这与其 pH 值适应范围相吻合。pH 值过低引起的酸化作用可导致细菌胞外分泌物质的变性<sup>[27]</sup>,而构成生物膜的主要成分就是一些胞外聚合物。Ulitzur<sup>[22]</sup>证明 pH 过高抑制细菌鞭毛的合成,不利于菌体聚集,从而影响生物膜形成。海水的 pH 值一般为 7.5~8.6,这表明天然海水的

pH 值有利于副溶血弧菌形成生物膜。

结果显示 Ca<sup>2+</sup>能促进副溶血弧菌形成生物膜,这与 C<sup>2+</sup>a 促进霍乱弧菌形成生物膜的结果相似<sup>[28]</sup>。在负电性的胞外聚合物基质中, Ca<sup>2+</sup>起到桥联作用。Banin 等<sup>[29]</sup>认为 C<sup>2+</sup>a 在不同程度上维护铜绿假单胞菌生物膜的结构。Yan 等<sup>[21]</sup>研究发现 C<sup>2+</sup>a 能促进弧菌的黏附作用,而黏附是生物膜形成的基础<sup>[20]</sup>。Banin 等<sup>[29]</sup>认为 Mg<sup>2+</sup>有利于铜绿假单胞菌生物膜的形成,但本实验显示加入 0.25%~1.5%的 Mg<sup>2+</sup>能显著抑制副溶血弧菌生物膜的形成。Dobson 等<sup>[30]</sup>发现加 Mg<sup>2+</sup>后的培养液具有亲水性,生物有机体分散生长,这可能是 Mg<sup>2+</sup>显著抑制副溶血弧菌生物膜形成的原因。

Villasefior 等<sup>[31]</sup>发现细菌在不同碳源基质上形成生物膜的效果不同。本文发现副溶血弧菌在大黄鱼不同部位的黏液和组织提取物包被的酶标板表明形成生物膜的效果各不相同,这可能是由于大黄鱼不同部位的黏液和组织提取物所含蛋白质、糖类各异,而糖和蛋白质在生物膜形成中发挥着重要作用<sup>[19]</sup>。Chen 等<sup>[12]</sup>发现溶藻弧菌对大黄鱼表皮、肠道与鳃黏液的黏附活性大于对酶标板的黏附活性,这可能与副溶血弧菌在大黄鱼表皮、肠道与鳃黏液包被的酶标板上生物膜形成效果较好有关。肝脏是副溶血弧菌的主要靶器官,而肌肉不是,这可能是导致该菌在肝脏与肌肉提取液包被的基质上生物膜形成效果不同的原因。

本文的研究结果表明:病原性副溶血弧菌能形成稳定的生物膜,而且能在大黄鱼表皮、肠道、鳃与肝脏等部位形成明显的生物膜;生物膜的形成与温度、NaCl 浓度、pH 等环境因子有着密切关系;副溶血弧菌形成的生物膜能与载体进行特异性的结合,还可借助 C<sup>2+</sup>a 促进生物膜的形成。

## 参考文献:

- [1] 鄢庆枇,义家波,陈强,等. 病原性副溶血弧菌在天然海水中的饥饿耐受研究[J]. 海洋学报, 2007, 29(3): 131—136.
- [2] 牟海津,李筠,包振民,等. 副溶血弧菌胞外产物对中国对虾的致病性分析[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(3): 273—280.
- [3] DANIELS N A, MACKINNON L, BISHOP R, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973—1998 [J]. J Infect Dis, 2000, 181(5): 1661—1666.
- [4] KANEKO T, COLWELL R R. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay [J]. Journal of Bacteriology, 1973, 113(1): 24—32.
- [5] HACKNEY C R, KLEEMAN E G, RAY B, et al. Adherence as a method of differentiating virulent and avirulent strains of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Appl Environ Microbiol, 1980, 40(3): 652—658.

- [6] STOODLEY P, SAUER K, DAVIES D G, et al. Biofilms as complex differentiated communities[J]. Annual Review of Biochemistry, 2002, 56: 187—209.
- [7] MELULENI G J, GROUT M, EVANS D J, et al. Mucoicid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm *in vitro* are killed by opsonic antibodies to the mucoicid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients[J]. Immunol, 1995, 155: 2029—2038.
- [8] COSTERTON J W, CHENG K J, GEESSEY G G, et al. Bacterial biofilms in nature and disease[J]. Annu Rev Microbiol, 1987, 41: 435—464.
- [9] CHICUREL M. Bacterial biofilms and infections. slimebusters[J]. Nature, 2000, 408(6810): 284—286.
- [10] ZHU J, MEKALANOS J J. Quorum sensing—dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*[J]. Developmental Cell, 2003, 5(4): 647—656.
- [11] 鄢庆彬, 王军, 苏永全, 等. 网箱养殖大黄鱼弧菌病研究[J]. 集美大学学报: 自然科学版, 2001, 6(3): 191—196.
- [12] PRATT L A, KOTLER 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.
- [13] CHEN Qiang, YAN Qing-pi, WANG Ke-juan, 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.
- [14] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Annual Biochemistry, 1976, 72: 248—254.
- [15] 李京宝. 一种海洋的弧菌胞外多糖 A101 的抗生物膜作用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- [16] KLAUSEN M, HEYDORN A, RAGAE P, et al. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants[J]. Mol Microbiol, 2003, 48: 1511—1524.
- [17] HOUDT R V, MICHELIS C W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation[J]. Research in Microbiology, 2005, 156: 626—633.
- [18] PAYNE G A, NYSTROM G J, BHATNAGAR D, et al. Cloning of the afl-2 gene involved in aflatoxin biosynthesis from *Aspergillus flavus*[J]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(1): 156—162.
- [19] SUTHERLAND I W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework[J]. Microbiology, 2001, 147(1): 3—9.
- [20] JOHNSON L R. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria[J]. Journal of Theoretical Biology, 2008, 251(1): 24—34.
- [21] YAN Qing-pi, CHEN Qiang, MA Shen, et al. Characteristics of adherence of pathogenic *Vibrio alginolyticus* to the intestinal mucus of Large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*)[J]. Aquaculture, 2007, 269: 21—30.
- [22] ULITZUR S. Effect of temperature, salts, pH and other factors on the development of peritrichous flagella in *Vibrio alginolyticus*[J]. Arch Microbiol, 1975, 104: 285—288.
- [23] 鄢庆彬, 陈强, 马牲, 等. 病原性溶藻弧菌对大黄鱼鳃液黏附作用研究[J]. 海洋学报, 2007, 29(6): 80—86.
- [24] 李涛, 宁喜斌. 副溶血性弧菌温度-盐度双因素预测模型的建立[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1200—1205.
- [25] ATSUMI T, MCCARTER L, IMAE Y. Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces[J]. Nature, 1992, 355: 182—184.
- [26] 刘代新, 宁喜斌, 张继伦. 响应面分析法优化副溶血性弧菌生长条件[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 306—310.
- [27] KNOX K W, HARDY L N, MARKEVICS L J, et al. Comparative studies on the effect of growth conditions on adhesion, hydrophobicity, and extracellular protein profile of *Streptococcus sanguis* G9B[J]. Infect Immun, 1985, 50(2): 545—554.
- [28] KIEREK K, WATNICK P I. The *Vibrio cholerae* O139 O-antigen polysaccharide is essential for  $Ca^{2+}$ -dependent biofilm development in sea water[J]. PNAS, 2003, 100(24): 14357—14362.
- [29] BANIN E, BRADY K M, GREENBERG E P. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm[J]. Microbiology, 2006, 72(3): 2064—2069.
- [30] DOBSON L F, OSHEA D G. Antagonistic effect of divalent cations  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  on the morphological development of *Streptomyces hygroscopicus* var *geldanus*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 81: 119—126.
- [31] VILLASEFIOR J C, VAN LOOSDRECHT M C M, PICIOREANU C, et al. Influence of different substrates on the formation of biofilms in a biofilm airlift suspension reactor[J]. Water Science and Technology, 2000, 41(4): 323—330.

# Characteristics of biofilm formation of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*

CHEN Zhen<sup>1</sup>, QIN Ying-xue<sup>1</sup>, ZOU Wen-zheng<sup>1</sup>, XU Xiao-jin<sup>1</sup>, XING Yan-li<sup>1</sup>, YAN Qing-pi<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety, Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** Biofilm formation of 12 strains of *Vibrio* were determined using the method of modified microtiter-plate test, and *V. parahaemolyticus* strain ND-02 was chosen for the further study on the influence of different environmental factors on bacterial biofilm formation. The results show that *V. parahaemolyticus* strain ND-02 forms mature biofilm in 24~36 h, *V. parahaemolyticus* with original bacterial concentrations of  $10^7$  and  $10^8$  CFU/mL shows the largest biofilm quantity; the  $OD_{590}$  value of bacterial biofilm increases with the incubation temperature from 10 °C to 30 °C and peaks at 30 °C; the  $OD_{590}$  value of bacterial biofilm fluctuates with different NaCl concentrations optimized at 3‰ to 5‰, and  $OD_{590}$  values are remarkably higher at pH 7~10, and peak at pH 7. Addition of  $C_a^{2+}$  obviously promoted the bacterial biofilm formation while  $M_g^{2+}$  played as an opposite role. *V. parahaemolyticus* strain ND-02 showed better biofilm formation on the wells coated with liver extract, skin mucus and intestinal mucus of *Pseudosciaena crocea*, the less biofilm was found on the wells coated with muscle extract. The results indicate that *V. parahaemolyticus* strain ND-02 develops stable and evident biofilm, the biofilm formation is remarkably affected by environmental factors, such as temperature, pH, NaCl concentration,  $C_a^{2+}$ ,  $M_g^{2+}$ . The results also indicate that the bacterial biofilm formation of *V. parahaemolyticus* is governable, which will be useful for the epidemic control in fish culture.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; biofilm; environmental factors