

抑制剂对副溶血性弧菌运动性的影响

渠宏雁¹, 李学鹏^{*1}, 孟良玉¹, 刘锦峰¹, 励建荣^{*1}, Jinru Chen²

(1. 渤海大学 食品科学研究院, 辽宁 锦州, 121013; 2. Department of Food Science and Technology, University of Georgia, GA 30223-1791, USA)

摘要: 通过添加不同抑制剂(EDTA、亚硝酸钠及氯化镁)观察副溶血性弧菌在泳动、群集和蹭行平板上迁移形成的可见圈大小来研究这些抑制剂对其运动性的影响。结果表明:EDTA、亚硝酸钠、氯化镁和茶多酚均可抑制副溶血性弧菌的泳动、群集及蹭行,培养基中分别含 0.20 mmol/L 的 EDTA、50 mg/L 亚硝酸钠、15.0 g/L 氯化镁时,能明显抑制副溶血性弧菌的三种运动行为。因此,三种抑制剂对副溶血性弧菌的运动性有明显的影响,可作为控制副溶血弧菌污染的有效手段。

关键词: 副溶血性弧菌;运动性;泳动;群集;蹭行

中图分类号:Q 934.1;TQ 920.1 文献标志码:A 文章编号:1673—1689(2014)05—0480—06

Effect of Inhibitors on the Motilities of *Vibrio parahaemolyticus*

QU Hongyan¹, LI Xuepeng^{*1}, MENG Liangyu¹, LIU Jinfeng¹, LI Jianrong^{*1}, Jinru Chen²

(1. Research Institute of Food Science, Bohai University, Jinzhou 121013, China; 2. Department of Food Science and Technology, University of Georgia, GA 30223-1791, USA)

Abstract: The effects of three inhibitors (ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), sodium nitrite and magnesium chloride) on the bacterial motilities of *Vibrio parahaemolyticus* were investigated by testing the flagellum-mediated swimming, flagellum-mediated swarming, and type IV pilus-mediated twitching on different plates. The motilities were evaluated by measuring the size of colony in the culture adding with EDTA, sodium nitrite and MgCl₂, respectively. The results showed that the three types of the motilities could be inhibited by EDTA, sodium nitrite, and magnesium chloride, and the effective concentrations of the three inhibitors in plates were 0.10 mmol/L, 50 mg/L, and 15.0 g/L, respectively. The results indicated that EDTA, sodium nitrite, and magnesium chloride have the strong influence on the motilities of *Vibrio parahaemolyticus*, so the three inhibitors can effective control the contamination of *Vibrio parahaemolyticus*.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, motility, swimming, swarming, twitching

收稿日期: 2013-08-18

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAD29B06)

* 通信作者: 李学鹏(1982—),男,山东菏泽人,工学博士,讲师,主要从事水产品贮藏加工方面的研究。E-mail: xuepengli8234@163.com
励建荣(1964—),男,浙江宁波人,工学博士,教授,博士研究生导师,主要从事水产品贮藏加工与、食品安全方面的研究。
E-mail: lijr6491@163.com

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 属于弧菌科弧菌属, 为革兰氏阴性嗜盐性海洋细菌^[1], 是海洋水体及海洋生物的主要致病菌之一, 同时也是一种重要的食源性病原菌^[2]。由其引发的食源性疾病居细菌性食物中毒的首位, 是当前全世界面临的公共卫生问题之一^[3-8]。运动性是细菌最基本的生物行为, 与其致病性具有密切联系。副溶血性弧菌主要有三种运动方式, 分别是泳动、群集以及蹭行。泳动 (swimming) 是细菌由鞭毛介导的, 在半固体培养基水膜上或固体培养基表面进行的运动, 能产生可见的生长圈, 是细菌的个体行为^[7-9]。而群集 (swarming) 与泳动不同, 它是一种细菌的群体性行为, 是菌体在液体培养基内或可湿固体培养基表面由鞭毛策动的特殊的细菌运动形式。与泳动相比, 发生群集运动的细菌菌体明显伸长, 鞭毛密度显著增加, 并伴随有表面活性剂的分泌, 有些细菌毒力蛋白分泌量也会增加^[10-11, 13-16]。与泳动和群集不同, 蹭行 (twitching) 不是由鞭毛介导的, 而是由位于细菌细胞端部的纤毛介导的, 是细菌通过自身的收缩和伸展使其在固体培养基表面产生的位置移动^[17-19]。

细菌的运动很可能是一个先于趋化现象而产生的进化事件^[14, 20], 具有重要的生态学和病理学意义, 对于病原细菌来说, 抑制其运动性是重要的治病因素之一^[21]。因此, 非常有必要搞清副溶血性弧菌的运动性及其抑制因子, 从而有针对性地控制其对食品及环境的影响。作者探讨了几种抑制剂 (EDTA、亚硝酸钠和氯化镁) 对副溶血性弧菌运动性的影响, 以期为副溶血性弧菌的控制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

副溶血性弧菌 ATCC17802 菌株: 购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。

1.2 培养基及仪器

3%氯化钠碱性蛋白胨水 (APW): 北京奥博星生物技术有限公司。运动性实验参照 Deziel 等^[22]的方法, 并略有改动。

泳动平板: 1.0 g/dL 胰蛋白胨, 1.5 g/dL 琼脂, 3 g/dL NaCl, 调 pH 至 8.0。

群集平板: 0.8 g/dL 营养肉汤, 0.5 g/dL 葡萄糖, 0.5 g/dL 琼脂, 3 g/dL NaCl, 调 pH 至 8.0。

蹭行平板: 2 g/dL LB 肉汤, 1 g/dL 琼脂, 调 pH 至 8.0。

VICTOR™X3 型酶标仪: 珀金埃尔默 (Perkin Elmer) 股份有限公司。

1.3 菌悬液的制备

将活化的菌种接种于 APW 液体培养基中, 28 ℃ 孵育 24 h, 低温高速离心 (10 000 r/min, 10 min)。弃去上清液, 收集菌体, 用无菌生理盐水配制成麦氏浊度为 2 的菌悬液 (即细菌浓度约为 6×10^8 个/mL), 4 ℃ 冷藏备用。

1.4 EDTA、亚硝酸钠和氯化镁对细菌生长的影响

采用酶标仪微量法, 对照组每孔加入 150 μL APW、50 μL 菌液及 50 μL 无菌水; EDTA 实验组每孔加入 150 μL APW、50 μL 菌液及 50 μL EDTA 溶液使其终浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.40 mmol/L; 亚硝酸钠实验组每孔加入 150 μL APW、50 μL 菌液及 50 μL 亚硝酸钠溶液使其终质量浓度分别为 50、100、200、400、600 mg/L; MgCl₂ 实验组每孔加入 150 μL APW、50 μL 菌液及 50 μL MgCl₂ 溶液, 使其终质量浓度分别为 2.5、5.0、10.0、15.0 g/L; 每个浓度均设 8 个平行。将各酶标板静置于培养箱中, 28 ℃ 培养 24 h, 通过酶标仪所测 OD₅₉₅ 值来确定 EDTA、亚硝酸钠和氯化镁对副溶血性弧菌生长的影响。

1.5 运动性测定

1.5.1 泳动 用灭菌牙签挑取副溶血性弧菌在 APW 琼脂培养基 (APW 40 g/L, 琼脂 10 g/L) 上形成的单菌落接种于泳动平板上, 28 ℃ 孵育 20 h, 观察并测量细菌从接种点迁移形成的浑浊区域的直径大小, 记录实验结果。

1.5.2 群集 用灭菌牙签挑取副溶血性弧菌单菌落接种于群集平板上, 28 ℃ 孵育 120 h, 观察并测量细菌从接种点迁移形成的分散区域的直径大小, 记录实验结果。

1.5.3 蹭行 用灭菌牙签挑取副溶血性弧菌单菌落接种于蹭行平板及培养皿间, 28 ℃ 孵育 24 h, 移除琼脂, 结晶紫染色 1~2 min, 小股自来水冲洗, 观察并测量被染色的区域直径大小, 记录实验结果。

1.6 抑制剂对运动性的影响测定

1.6.1 EDTA 的影响 参照 1.3 运动性测定的方法, 向平板中加入 EDTA, 使其终浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.40 mmol/L, 以不添加 EDTA 的平板为

对照,每组设置 5 个平板作为平行,观察并记录结果。

1.6.2 亚硝酸钠的影响 向平板中加入亚硝酸钠,使其终质量浓度分别为 50、100、200、400、600 mg/L,以不添加亚硝酸钠的平板为对照,其余条件不变,参照运动性测定的方法培养,每组设置 5 个平板作为平行,观察并记录结果。

1.6.3 氯化镁的影响 向平板中加入氯化镁,使其终质量浓度分别为 2.5、5.0、10.0、15.0 g/L,以不添加氯化镁的平板为对照,其余条件不变,参照运动性测定的方法培养,每组设置五个平板作为平行,观察并记录结果。

2 结果与讨论

2.1 EDTA、亚硝酸钠、氯化镁对副溶血性弧菌生长的影响

图 1 显示了三种试剂对副溶血性弧菌生长的影响。与对照组相比,添加 EDTA 和亚硝酸钠的各实验组 OD₅₉₅ 值均明显下降,且添加量越大,OD 值越小。因此,低浓度的 EDTA 溶液和亚硝酸钠溶液均对副溶血性弧菌的生长具有明显的抑制作用,且抑制效果随浓度的增大而增强。但浓度为 0.10 mmol/L 的 EDTA 和 200 mg/L 的亚硝酸钠就已明显抑制副溶血性弧菌生长,继续增大添加量意义不大。因此,EDTA 和亚硝酸钠均能明显抑制副溶血性弧菌生长,最佳抑制浓度分别为 0.10 mmol/L 和 200 mg/L。MgCl₂ 对副溶血性弧菌的生长情况的影响则与此不同。实验组所测 OD 值明显高于对照组,且随着培养基中 MgCl₂ 质量浓度的增大而增大,由此可知,氯化镁可以促进副溶血性弧菌的生长,且质量浓度越大促进效果越明显。

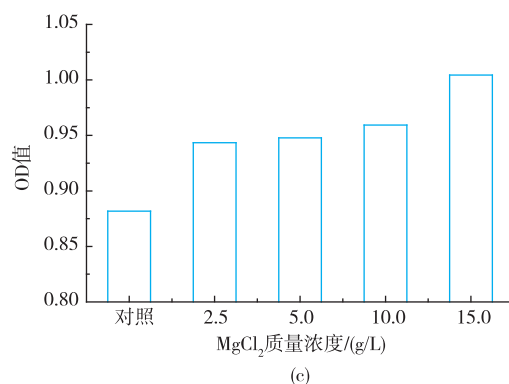
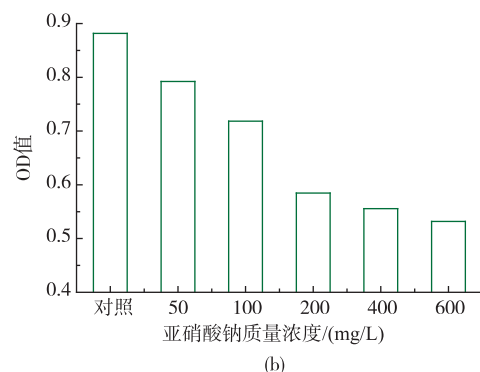
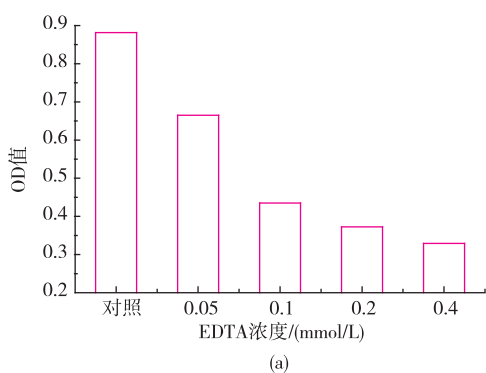


图 1 EDTA、亚硝酸钠及氯化镁对副溶血性弧菌生长的影响
Fig. 1 Effects of EDTA, Sodium nitrite, and MgCl₂ on growth of *Vibrio parahaemolyticus*

2.2 三种抑制剂对副溶血性弧菌泳动的影响

由图 2 可知,对照组(不添加抑制剂)中副溶血性弧菌在泳动平板上形成的菌落直径最大,而添加抑制剂时,培养基上形成的可见菌落出现了变化,由图 a 可知,培养基中 EDTA 浓度为 0.05~0.20 mmol/L 时,测量值随其浓度的增大而明显减小,但浓度为 0.40 mmol/L 时,所测直径与 0.20 mmol/L 时相比无明显变化,这与图 1 所得 EDTA 对副溶血性弧菌生长的影响并不完全相同,说明 EDTA 对副溶血性弧菌泳动的影响并不仅仅是由其对其菌体生长的影响所造成的。因此,EDTA 对副溶血性弧菌的泳动行为有抑制作用,且培养基中 EDTA 浓度为 0.20 mmol/L 时就能达到良好抑制效果。由图 b 可知,添加 50 mg/L 亚硝酸钠后菌落所测直径明显减小,其后增大亚硝酸钠添加量对所测区域直径影响不大,说明 50 mg/L 亚硝酸钠对副溶血性弧菌的运动性已起到明显的抑制作用,继续增大添加量意义不大。该质量浓度小于亚硝酸钠对副溶血性弧菌生长的最佳抑制质量浓度 200 mg/L,可见亚硝酸钠对副溶血性弧菌泳动的抑制效果强于对其菌体生长的抑

制效果。对比图 a 和图 b,培养基中含 0.20 mmol/L EDTA 时副溶血性弧菌泳动形成的菌落直径明显小于含 50 mg/L 亚硝酸钠时,因此,EDTA 对副溶血性弧菌泳动行为的抑制作用比亚硝酸钠强。由图 c 可知,氯化镁处理组中泳动平板上所形成的菌落直径明显减小,且具有质量浓度依赖性,所测直径随着氯化镁质量浓度的增大而减小。可见,氯化镁对副溶血性弧菌的泳动行为具有较好的抑制作用,且抑制效果随着添加量的增大而增大,这与氯化镁对细菌生长的影响情况截然相反。

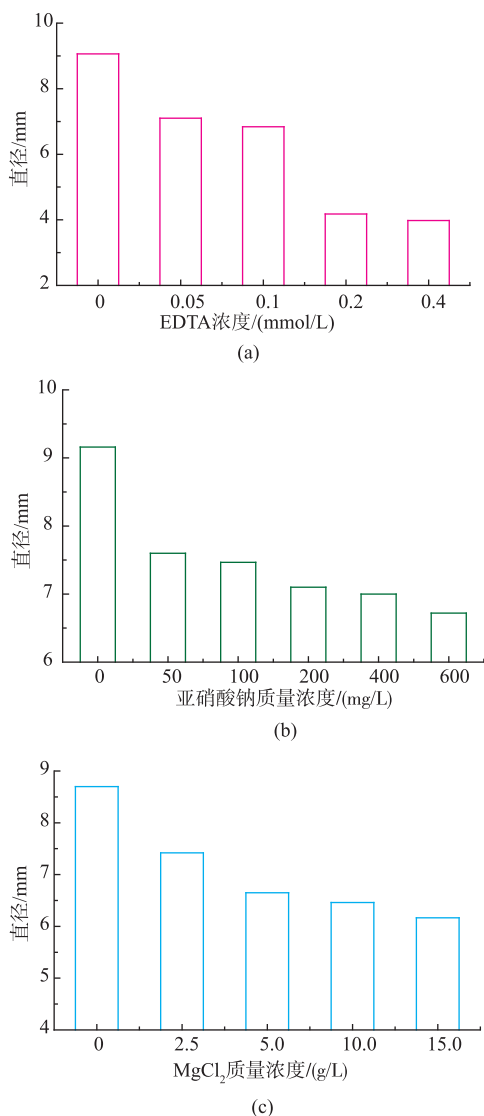


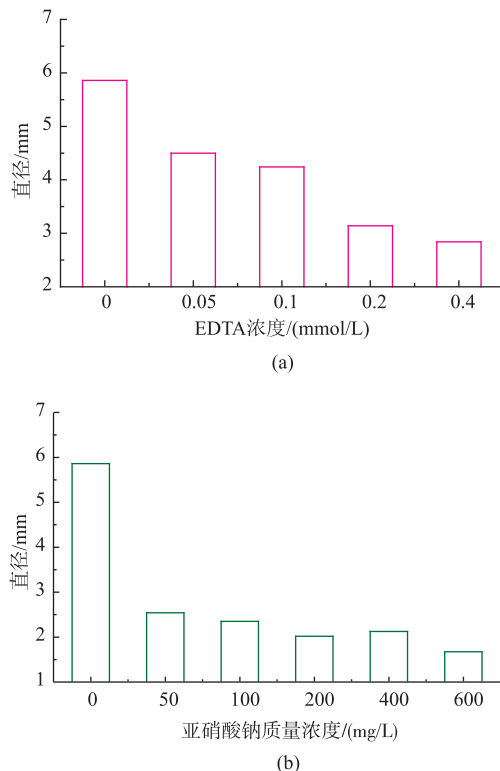
图 2 抑制剂对泳动的影响

Fig. 2 Effects of inhibitors on swimming motility of *Vibrio parahaemolyticus*

2.3 抑制剂对副溶血性弧菌群集的影响

图 3 反映了三种抑制剂对副溶血性弧菌群集

行为的影响情况。由图 3 可知,三种抑制剂都对副溶血性弧菌的群集行为有明显的抑制作用,且最佳抑制浓度为分别为 EDTA 0.20 mmol/L、亚硝酸钠 50 mg/L 和氯化镁 15.0 g/L,这与泳动实验结果一致。对比图 a、b 和图 c 可知,培养基中含 0.20 mmol/L EDTA、200 mg/L 亚硝酸钠或 15.0 g/L 氯化镁时副溶血性弧菌群集运动所形成的菌落直径分别为 (3.14 ± 0.07) 、 (2.54 ± 0.20) 、 (2.63 ± 0.12) mm,因此,亚硝酸钠和氯化镁对副溶血性弧菌群集运动的抑制效果比 EDTA 强,这与泳动的实验结果并不相同。另外,副溶血性弧菌的群集行为远弱于同样温度、pH 和氯化钠质量浓度时的泳动和蹭行行为,且在群集平板上形成明显的边缘发散型菌落的时间也长于铜绿假单胞杆菌所需的 24 h^[21],这可能是由于副溶血性弧菌本身鞭毛在绝大多数情况下都单端生长的特性决定的。Banin^[23]等认为加入 Mg^{2+} 后的培养基具有亲水性,生物有机体分散生长,这可能减小了个菌体间对培养基营养素的竞争,加快了菌体繁殖,使得细菌总量增加,但这种分散生长也有可能导导致培养基表面单位面积上的细菌数量下降,从而影响了细菌群体的运动性。



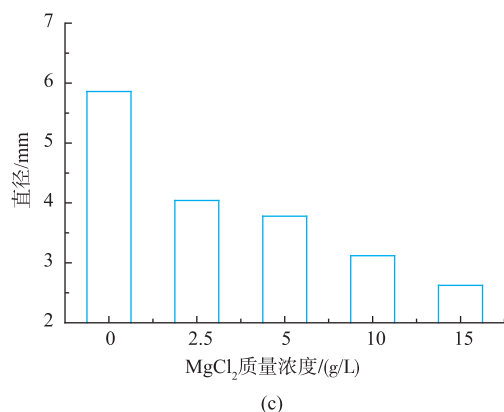


图3 抑制剂对群集的影响

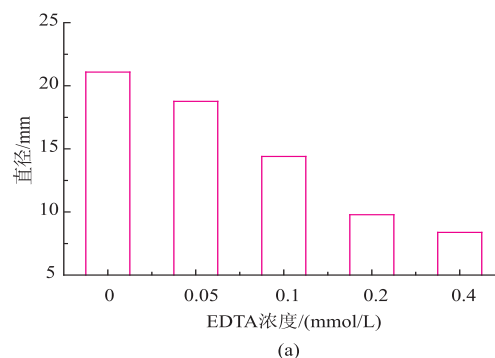
Fig. 3 Effects of inhibitors on swarming motility of *Vibrio parahaemolyticus*

2.4 抑制剂对副溶血性弧菌蹭行的影响

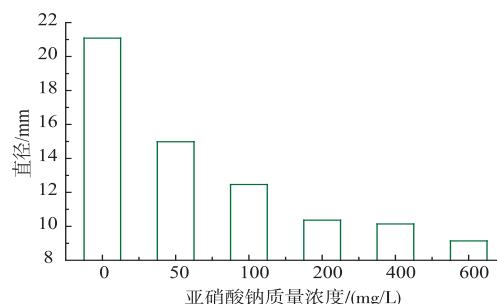
图4中,与对照组相比,分别添加EDTA、亚硝酸钠及氯化镁的实验组结晶紫染色区域直径明显减小,且都是浓度越大直径越小。EDTA浓度为0.4 mmol/L时,所测直径与0.20 mmol/L时相比变化不明显,因此EDTA对蹭行运动的最佳抑制浓度为0.2 mmol/L。EDTA浓度为0.1 mmol/L时结晶紫染色区域直径与对照组相比明显减小,而浓度为0.05 mmol/L时与对照组并无明显区别,这与图2(a)、图3(a)并不相同,说明EDTA对副溶血性弧菌三大运动的影响并不完全相同。由图a可知,添加50 mg/L亚硝酸钠后结晶紫染色区域直径明显减小,其后增大亚硝酸钠添加量对所测区域直径影响不大,说明50 mg/L亚硝酸钠对副溶血性弧菌的蹭行行为已起到明显的抑制作用,继续增大添加量意义不大。对比图a~c可知,培养基中含0.20 mmol/L EDTA、200 mg/L亚硝酸钠或15.0 g/L氯化镁时蹭行平板上结晶紫染色区域分别为 (8.38 ± 0.71) 、 (10.36 ± 0.87) 、 (13.72 ± 0.35) mm,因此,EDTA对副溶血性弧菌蹭行的抑制作用最强,而氯化镁的抑制作用最弱。这可能是因为EDTA对IV型菌毛的抑制作用比亚硝酸钠和氯化镁强造成的。

参考文献:

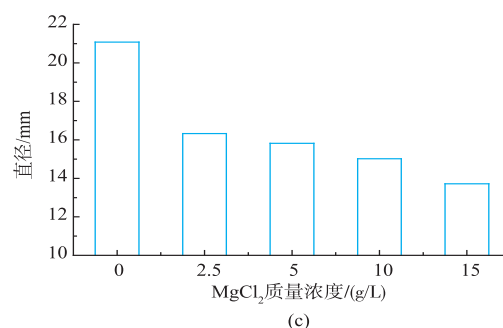
- [1] 陈家华. 现代食品分析新技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005:428-436.
 - [2] 高玮, 潘迎捷, 赵勇. 上海市水产品中副溶血性弧菌的分离、鉴定及独立基因和血清型分布 [J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(2):278-282.
- GAO Wei, PAN Yingjie, ZHAO Yong, et al. Isolation, Identification, serotype and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the aquatic products in Shanghai markets [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30 (2):278-282. (in



(a)



(b)



(c)

图4 抑制剂对蹭行的影响

Fig. 4 Effects of inhibitors on twitching motility of *Vibrio parahaemolyticus*

3 结语

EDTA、亚硝酸钠和氯化镁三种物质对副溶血性弧菌的运动性均具有明显抑制作用,当浓度分别为0.20 mmol/L、50 mg/L和15.0 g/L时,均已达到明显的抑制效果,其中又以EDTA的抑制效果最好,亚硝酸钠的抑制效果最差。

- Chinese)
- [3] 马光刚,郭福生,王娟,等.海产品中副溶血弧菌的分离与鉴定[J].中国动物检疫,2002,19(9):25-28.
MA Guanggang, GUO Fusheng, WANG Juan, et al. Isolation and identification of *Vibrio parahaemolyticus* in sea products[J]. **Chinese Journal of Animal Quarantine**, 2002, 19(9): 25-28. (in Chinese)
 - [4] Zhu D S, Zhou M, Fan Y L, et al. Identification of New Target Sequences for PCR Detection of *Vibrio Parahaemolyticus* by Genome Comparison[J]. **J Rapid Meth Auto Mic**, 2009, 17(1): 67-79.
 - [5] 王璐华,宁喜斌.副溶血性弧菌的温度预测模型[J].食品与生物技术学报,2009,28(2):262-266.
WANG Luhua, NING Xibin. Predictive model for effect of temperature on the growth of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(2): 206-266. (in Chinese)
 - [6] 方伟,杨杏芬,柯昌文.副溶血性弧菌分型研究进展[J].中华疾病控制杂志,2008,12(5):468-472.
FANG Wei. YANG Xingfen, KE Changwen. Review on subtyping study of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. **Chin J Dis Control Prev**, 2008, 12(5): 468-472. (in Chinese)
 - [7] 鄢庆枇,义家波,陈强,等.病原性副溶血性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.
YAN Qingpi, YI Jiabo, CHEN Qiang, et al. Starvation responses of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in natural seawater[J]. **Acta Oceanologica Sinica**, 2007, 29(3): 131-136. (in Chinese)
 - [8] 苏靖华,章红红,傅慧琴,等.副溶血性弧菌160株血清群型分布和耐药性分析[J].上海预防医学,2012,24(3):135-138.
SU Jinghua, ZHANG Honghong, FU Huiqin, et al. Analysis of 160 serotypes and drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. **Shanghai Journal of Preventive Medicine**, 2012, 24(3): 135-138. (in Chinese)
 - [9] Wilson R, Dowling R B. *Pseudomonas aeruginosa* and other related species[J]. **Thorax**, 1998, 53: 213-219.
 - [10] Harshey R M, Matsuyama T. Dimorphic transition in *Escherichia coli* *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells[J]. **P Natl Acad Sci USA**, 1994, 91(18): 8631-8635.
 - [11] 贾雄飞.奇异变形杆菌周周期性群集运动研究[D].重庆:第三军医大学,2005.
 - [12] 姚宏明.铜绿假单胞杆菌生物被膜形成早期相关基因的研究[D].天津:南开大学,2005.
 - [13] Harshey R M. Bees aren't the only ones; swarming in gram-negative bacteria[J]. **Mol Microbiol**, 1994, 13: 389-394.
 - [14] 平立岩.细菌泳动时的细胞取向:理论模拟与实验测定的研究进展[J].中国科学,2012,42(4):259-268.
PING Linyan. Cell orientation of swimming bacteria: from theoretical simulation to experimental evaluation [J]. **Science China**, 2012, 42(4): 259-268. (in Chinese)
 - [15] Henrichsen J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification[J]. **Bacteriol Rev**, 1972, 36: 478-503.
 - [16] Howard C B. Swarming motility: it better be wet[J]. **Curr Biol**, 2005, 15(15): 599-600.
 - [17] Semmler A B T, Whitchurch C B, Leech A J, et al. Identification of a novel gene, fimV, involved in twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **Microbiol**, 2000, 146(6): 1321-1332.
 - [18] Rashid M H, Rumbaugh K, Passador L, et al. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. **PNAS**, 2000, 97(17): 9636-9641.
 - [19] 单志英,徐海津,施兴启,等.铜绿假单胞菌蹭行运动相关基因的研究[J].微生物学报,2004,44(3):319-323.
SHAN Zhiying, XU Haijin, SHI Xingqi, et al. Study on genes involved in twitching motility of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2004, 44(3): 319-323. (in Chinese)
 - [20] Wei Y, Wang X, Liu J, et al. The population dynamics of bacteria in physically structured habitats and the adaptive virtue of random motility[J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2011, 108: 4047-4052.
 - [21] Wadhams G M, Armitage J P. Making sense of it all: bacterial chemotaxis[J]. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2004, 5(12): 1024-1037.
 - [22] Deziel E, Comeau Y, Villemur R. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities [J]. **J Bacteriol**, 2001, 183(4): 1195-1204.
 - [23] Banin E, Brady K M, Greenberg E P. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2006, 72(3): 2064-2069.