

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01084

灿烂弧菌的疏水性和生物被膜形成能力

李华, 王扬, 李强, 乔帼

大连海洋大学 农业部海洋水产增养殖学重点开放实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 以仿刺参“化皮”病病原菌—灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)AP622 为试验菌株, 研究了培养材料、培养时间、培养基、葡萄糖浓度对菌株生物被膜形成能力的影响, 证实鞭毛和菌毛介导的运动性, 同时比较了浮游细菌与形成生物被膜的细菌对抗生素的敏感性, 并研究了菌株的疏水性。结果表明, 菌株 AP622 为高疏水性和高生物被膜形成菌株, 在聚乙烯为培养材料、含葡萄糖浓度为 0.5%、LB 培养基中形成的生物被膜最多, 生物被膜形成周期为 24 h。菌株 AP622 明显表现出鞭毛介导的群集性和IV型菌毛介导的颤播等运动力。生物被膜中的菌株 AP622 对抗生素的抵抗力明显强于浮游细菌, 其最小抑菌浓度(MIC)是浮游细菌的 32 倍。综上所述, 菌株 AP622 具有很强的疏水性和高生物被膜形成能力, 判断其具有很强的黏附力, 同时具有明显的抗药性。

关键词: 仿刺参; 灿烂弧菌; 生物被膜; 运动性; 疏水性

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)05-1084-08

细菌的黏附力是决定细菌致病性的关键环节, 其中疏水性和生物被膜的形成能力是评价细菌黏附力的重要指标^[1-3]。细菌表面疏水性在宿主表面黏附和微生物随后的增殖过程中是一个重要的影响因素, 其能够影响细菌对营养物质的利用和黏附过程, 进而影响细菌的分布, 疏水性强的菌株黏附能力强^[4]。细菌生物被膜是菌体附着到物体表面后分泌黏性胞外聚合物并在其中生长繁殖而形成的细菌群落, 形成生物被膜的细菌可以抵抗宿主的免疫清除, 对抗生素的抵抗力增加, 并提高病原菌进一步感染的可能性^[1]。另外, 细菌表面疏水性和生物被膜形成能力两个指标的强弱均受菌株鞭毛、菌毛所介导的运动性的影响^[1,5]。

灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)是水产动物重要的致病菌, 除普遍感染仿刺参(*Apostichopus japonicus*)^[6-7]导致其死亡外, 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)^[8]、文蛤(*Ruditapes decussatus*)^[9]、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[10]等多种水产动物也深受

其害。迄今, 有关灿烂弧菌致病因子的研究主要集中于蛋白酶^[11]、胞外产物^[12]和铁载体^[8]等, 而对菌体黏附力的研究未见报道。

本研究以仿刺参“化皮病”病原菌—灿烂弧菌为研究对象, 通过研究菌株表面疏水性、生物被膜的形成能力及菌株运动性, 进而判断灿烂弧菌的黏附能力, 为探索灿烂弧菌的致病机制及有效防治技术提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*, AP622)由大连海洋大学病害实验室分离自患病仿刺参。灿烂弧菌(*V. splendidus*, KCTC12679)、哈维弧菌(*V. harveyi*, ATCC14126)、黄海希瓦氏菌(*Shewanella marisflavi*, KCCM41822)、鳃弧菌(*V. anguillarum*, HUFP5001)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*, KCCM 40513)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*, KCTC2471)、河流弧菌

收稿日期: 2010-09-28; 修订日期: 2011-01-20.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800853); 国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAD13B03); 海洋公益性行业科研专项(200905020).

作者简介: 李华(1958-), 女, 教授, 研究方向为水产动物病害学. E-mail: lihua@dlou.edu.cn

(*V. fluvialis*, KCCM40827)和大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC29532)参考菌株均为韩国釜庆大学疾病预防实验室赠送。

1.2 疏水性的测定

1.2.1 盐-凝集(SAT)实验 SAT 的测定参考孙理云等^[13]的方法进行。用 0.002 mol/L 的 NaH_2PO_4 (pH 6.8)配制浓度梯度为 0.2 mol/L, 浓度范围为 0.2~4.0 mol/L 的系列硫酸铵溶液。用 Santos 等^[14]提出的疏水性标准评估试验菌株的疏水性。SAT 具体标准如下: 0~1.0 mol/L 为高度疏水, 1.0~2.0 mol/L 为中度疏水, 2.0~4.0 mol/L 为轻度疏水, >4.0 mol/L 为非疏水。

1.2.2 微生物黏附碳氢化合物实验(MATH) MATH 实验参考 Won 等^[15]的方法进行。选用二甲苯作为有机相。

用 Santos 等^[14]提出的疏水性标准评估实验菌株的疏水性。细菌的疏水性用细菌细胞表面疏水率(CSH%)表示, $\text{CSH}\% = (D_0 - D_i)/D_0 \times 100\%$, D_0 为初始菌液的 OD_{600} 值, D_i 为终末菌液的 OD_{600} 值。MATH 具体标准如下:

$\text{CSH}\% > 50\%$ 为高度疏水, $\text{CSH}\%$ 介于 20% 和 50% 为中度疏水, $\text{CSH}\% < 20\%$ 为非疏水。

1.3 生物被膜形成的定量研究

1.3.1 不同菌株生物被膜形成的定量分析 生物被膜形成量参考 O'Toole 等^[16]的方法进行测定。将灿烂弧菌 AP622 和灿烂弧菌参考菌株、哈维弧菌和大肠杆菌参考菌株用 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L; 酵母提取物 5 g/L)调整菌液浓度为 $10^6/\text{mL}$ 。分别取 3 mL 加入聚氯乙烯(PVC)管中, 28℃ 孵育 24 h, 用灭菌的 PBS(0.01 mol/L, pH 7.2, 下同)洗 3 次, 干燥, 加入 1% 结晶紫(CV) 室温染色 15 min, 再洗涤 3 次, 干燥, 加入 95% 乙醇溶解 PVC 管上结合的 CV, 600 nm 测吸光值。对照组为不加菌悬液的 LB 培养基。

1.3.2 不同培养材料、时间对生物被膜形成的影响 将浓度为 $10^6/\text{mL}$ 的灿烂弧菌 AP622, 分别加入到聚氯乙烯、聚丙烯、硼硅酸盐玻璃 3 种不同材料的圆底管中, 28℃ 孵育 24 h, 用 1.3.1 中方法测定生物被膜的形成量。

将浓度为 $10^6/\text{mL}$ 的灿烂弧菌 AP622 加入到聚氯乙烯(PVC)管中, 分别在 0、4、8、12、16、20、24、32、40、48、60、72 h 不同培养时间点取样, 用 1.3.1 中方法测定生物被膜的形成量。

1.3.3 不同培养基、葡萄糖浓度对生物被膜形成的影响 将灿烂弧菌 AP622 分别用 TSB(胰蛋白胨 15 g/L; 大豆蛋白胨 5 g/L)、LB、M63[68 g/L KH_2PO_4 , 10 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.246 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L D-葡萄糖], CM9(12.8 g/L Na_2HPO_4 , 3 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L NaCl, 1.0 g/L NH_4Cl , 2.0 g/L D-葡萄糖, 0.494 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.015 2 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/L 硫胺素, 0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/L 酪蛋白氨基酸)培养基调整浓度为 $10^6/\text{mL}$, 28℃ PVC 管中孵育 24 h, 用 1.3.1 中方法测定生物被膜的形成量。

将灿烂弧菌 AP622 分别用葡萄糖质量分数分别为 0%、0.05%、0.125%、0.25%、0.5%、0.75%、1% 的 LB 培养基调整数量为 $10^6/\text{mL}$, 28℃, PVC 管中孵育 24 h, 用 1.3.1 中方法测定生物被膜的形成量。

1.4 运动性的测定

运动性的测定参照 Deziel 等^[17]的方法进行。试验菌株包括灿烂弧菌 AP622 及参考菌株 KCTC 12679、黄海希瓦氏菌 KCCM41822、鳗弧菌 HUFP 5001、溶藻弧菌 KCCM 40513、哈维弧菌 ATCC 14126、副溶血弧菌 KCTC2471、河流弧菌 KCCM 40827 和大肠杆菌 ATCC29532。

1.4.1 泳动(swimming) 挑取上述 9 株试验菌株, 接种于 NA 培养基(蛋白胨 10 g/L, 肉浸粉 3 g/L, 琼脂 15 g/L), 将 28℃ 培养 24 h 形成的单菌落用灭菌牙签接种于胰蛋白胨泳动平板(胰蛋白胨 10 g/L, 琼脂 3 g/L)上, 28℃ 孵育 16 h。通过测量细菌从接种点迁移形成的浑浊区域的直径来判断菌株的运动性。

1.4.2 群集(swarming) 将 1.4.1 培养的单菌落, 用灭菌牙签接种于群集平板(营养肉汤 8 g/L, 葡萄糖 5 g/L, 琼脂 5 g/L)上, 28℃ 孵育 24 h, 通过观察菌株在培养基上的扩散程度来判断菌株的群集能力。

1.4.3 颤搐(twitching) 将 1.4.1 培养的单菌落, 用灭菌牙签穿过薄的(3 mm)LB 琼脂(胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 琼脂 10 g/L), 接种于培养皿的底部, 28 °C 孵育 24~48 h。形成生物被膜的菌株在琼脂和培养基之间会出现生长的朦胧区域。移走琼脂, 洗掉未黏附的细菌后用 1%结晶紫染色, 检测细菌的黏附能力。

1.5 浮游细菌和生物被膜重悬细菌对抗生素的敏感性试验

1.5.1 浮游细菌最小抑菌浓度(MIC)的测定 浮游细菌最小抑菌浓度的测定参照李彩云等^[18]的方法进行, 设定 3 个平行组。将灿烂弧菌 AP622 和参考菌株用 NB 培养基(蛋白胨 10 g/L, 肉浸粉 3 g/L)调整至 10^6 /mL, 分别与等量 0~1 024 mg/mL 不同质量浓度的硫酸庆大霉素(纯度>590 µg/mg)混合后, 28 °C 培养 24 h, 肉眼观察细菌的生长情况。将没有细菌生长的试验管浓度作为硫酸庆大霉素对菌株的最小抑菌浓度(MIC)。

1.5.2 浮游细菌对抗生素的敏感性试验 浮游细菌对抗生素的敏感性试验参照 Walters 等^[19]的方法进行。灿烂弧菌 AP622 和参考菌株用 PBS 重悬稀释至 10^6 /mL, 分别加入硫酸庆大霉素, 使其终浓度为 $10\times$ MIC。28 °C, 180 r/min 振荡培养, 于 30 min、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h、3.5 h、4 h、24 h 取样, 进行细菌平板计数。

1.5.3 生物被膜重悬细菌最小抑菌浓度(MIC)的测定 灿烂弧菌 AP622 和灿烂弧菌参考菌株接种于 TSB 培养基中, 28 °C 振荡培养 20 h, 用 PBS 稀释菌悬液至吸光值 $OD_{600}=0.2$; 聚碳酸酯微孔滤膜(直径约 25 mm)紫外灭菌, 贴于 TSA 培养基表面, 取 5 µL 菌悬液接种于聚碳酸酯膜上, 28 °C 孵育 48 h, 聚碳酸酯膜及所生成的生物被膜每隔 12 h 转移至新的 TSA 平板上。生物被膜重悬细菌最小抑菌浓度的测定参照李彩云等^[18]的方法进行。将培养 48 h 后形成的生物被膜, 放入 9 mL 灭菌的 PBS 中, 高速涡旋振荡 2 min 重悬细菌, 然后按 1.5.1 方法测定最小抑菌浓度。

1.5.4 生物被膜重悬细菌对抗生素的敏感性试验 生物被膜重悬细菌的制备同方法 1.5.3, 对抗生素

敏感性试验同 1.5.2 的测定方法。

1.6 数据处理

数据采用 SPSS17.0 软件进行处理。结果以 $\bar{x}\pm SD$ 表示。当 $P<0.05$ 时认为差异显著。

2 结果与分析

2.1 菌株的疏水性

在盐-凝集试验中, 灿烂弧菌 AP622 和参考菌株的凝集能力差异较大。灿烂弧菌 AP622 在 0.6 mol/L 的硫酸铵溶液中开始凝集, 并且凝集速度很快, 根据 Santos 等^[14]的判断标准为高度疏水菌株; 参考菌株 KCTC12679 在 3.6 mol/L 的硫酸铵溶液中凝集, 为轻度疏水菌株。

微生物黏附碳氢化合物试验显示, 灿烂弧菌 AP622 的 CSH%为 54.83%, 为高度疏水菌株; 参考菌株 KCTC12679 的 CSH%为 21.40%, 为中度疏水菌株。

2.2 不同菌株生物被膜形成能力的比较

本研究采用研究生物被膜的传统技术—结晶紫(CV)染色方法对生物被膜的形成进行了定量研究。结果表明, 不同菌株的生物被膜形成能力存在显著性差异($P<0.05$)(图 1)。灿烂弧菌 AP622 表现出了高生物被膜形成能力, 大肠杆菌次之, 而其他菌株的生物被膜形成能力很弱。

2.3 不同培养条件对菌株生物被膜形成能力的影响

2.3.1 培养材料 培养材料可显著影响灿烂弧菌 AP622 生物被膜形成($P<0.05$)。灿烂弧菌 AP622 最易在聚氯乙烯材料上形成生物被膜, 而在硼硅酸盐玻璃上形成的生物被膜量最少(图 2A)。

2.3.2 培养基 培养基对灿烂弧菌 AP622 生物被膜形成的影响显著($P<0.05$)。菌株 AP622 最易在 LB 培养基上形成生物被膜, 其次是 M63 和 TSB 培养基, 在低营养培养基 CM9 中不能形成生物被膜(图 2B)。

2.3.3 葡萄糖浓度 葡萄糖浓度对灿烂弧菌 AP622 生物被膜形成的影响显著($P<0.05$)。葡萄糖质量分数为 0.5%时, 菌株 AP622 生物被膜形成能力最强, 随添加浓度进一步增大, 生物被膜的形成量反而降低(图 2C)。

2.3.4 培养时间 培养时间对灿烂弧菌 AP622 生物被膜形成的影响存在显著性差异($P<0.05$)。灿烂弧菌 AP622 在培养 4 h 之后, 生物被膜形成量明显增加, 且在 24 h 之内一直呈递增趋势, 24 h 后开始下降(图 2D)。之后, 灿烂弧菌 AP622 生物被膜的形​​成呈现上下波动, 48 h 和 72 h 时均为波峰值。上述结果表明, 灿烂弧菌 AP622 以 24 h 为 1 个生物被膜形成周期, 从浮游细菌到生物被膜细菌形成时间约为 24 h, 24 h 后生物被膜上的细菌

脱离生物被膜再次成为浮游细菌, 然后进行再次黏附(图 2D)。

2.4 运动性

泳动是由鞭毛介导的运动力, 其强弱可通过细菌在软琼脂培养基上从接种点迁移的程度来判断。9 株试验菌株, 仅有大肠杆菌、副溶血弧菌和河流弧菌在平板上有微弱的迁移, 其他菌株均没有迁移。群集也是由鞭毛介导的运动力, 灿烂弧菌 AP622、大肠杆菌、副溶血弧菌、哈维弧菌群

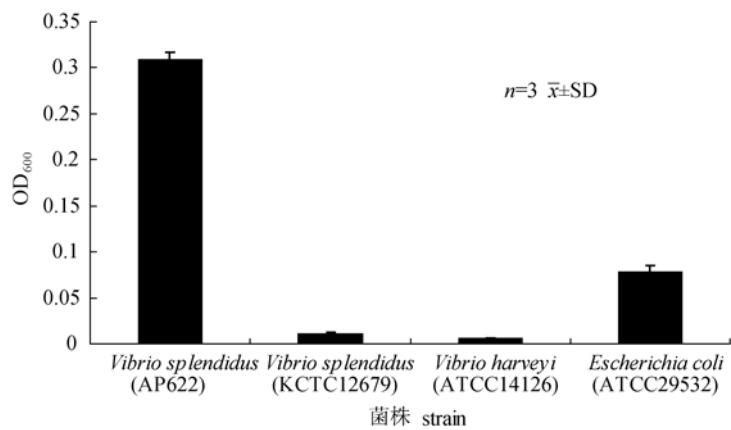


图 1 不同菌株生物被膜形成能力的比较

Fig.1 Comparison on biofilm formation capability of different bacteria strains

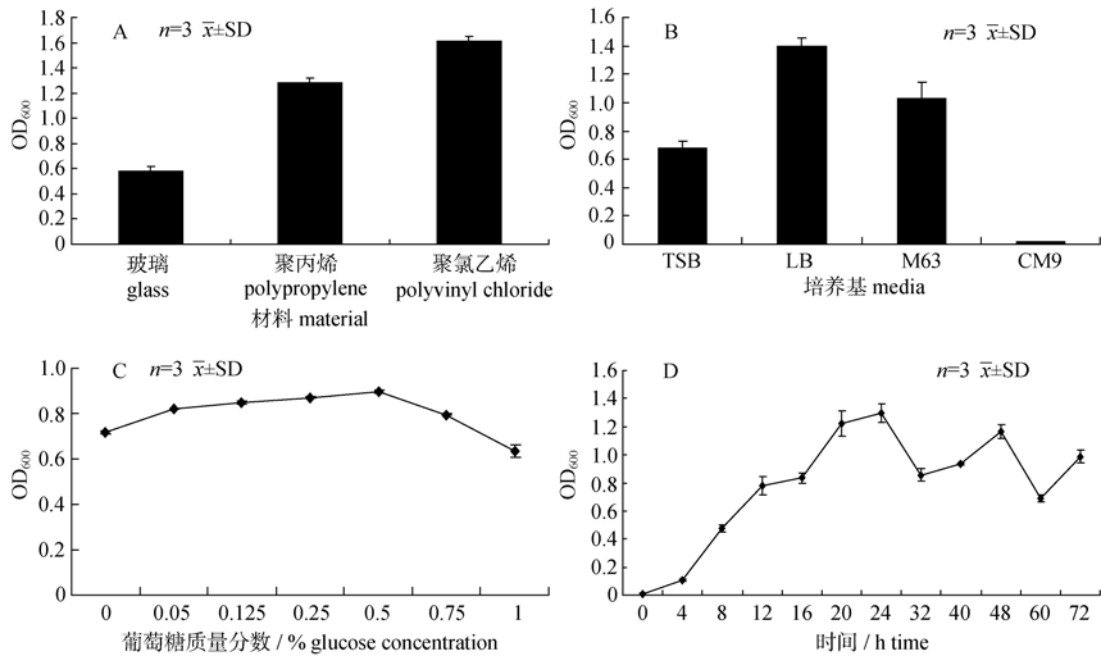


图 2 不同因素对灿烂弧菌 AP622 生物被膜形成的影响

A: 实验材料; B: 培养基; C: 葡萄糖浓度; D 培养时间.

Fig.2 Effect of different factors on biofilm formation of *Vibrio splendidus* AP622
A: materials; B: media; C: concentration of glucose D: culturing time.

集现象明显, 灿烂弧菌 KCTC12679 存在微弱的群集, 鳗弧菌、黄海希瓦氏菌、河流弧菌和溶藻弧菌无群集能力。颤搐是IV型菌毛介导的运动力, IV型菌毛来回伸缩, 驱使细菌在表面穿梭, 具有颤搐能力的菌株, 在穿刺接种、孵育之后会在接种处周围形成朦胧的生长区域。灿烂弧菌 AP622、大肠杆菌、鳗弧菌、副溶血弧菌、哈维弧菌、河流弧菌在穿刺点处都有不同程度的扩散; 灿烂弧菌 KCTC12679、黄海希瓦氏菌和溶藻弧菌无明显扩散。将培养基移除后, 能扩散的菌株在接种处周围形成朦胧区域, 结晶紫染色后灿烂弧菌 AP622 形成的朦胧区域呈现明显的梅花状, 河流弧菌、大肠杆菌、副溶血弧菌和鳗弧菌呈现大小不一的斑块状(表 1)。

2.5 浮游细菌和生物被膜重悬细菌对抗生素的敏感性

硫酸庆大霉素对灿烂弧菌 AP622 和灿烂弧菌参考菌株浮游细菌的 MIC 分别为 4 μg/mL 和 256 μg/mL, 而对其生物被膜重悬细菌的 MIC 分别为 128 μg/mL 和 1 024 μg/mL。灿烂弧菌 AP622 生物被膜重悬细菌的 MIC 是浮游细菌 MIC 的 32 倍, 而参考菌株生物被膜重悬细菌的 MIC 仅是浮游细菌 MIC 的 4 倍。

浮游细菌和生物被膜重悬细菌的药物敏感性试验是在 10 倍 MIC 浓度下测定的, 结果如图 3

所示。随孵育时间的延长, 两株菌的数量均呈现下降趋势, 且浮游细菌下降速度明显快于生物被膜重悬细菌($P<0.05$)。菌株 AP622 和灿烂弧菌参考菌株浮游细菌在 2.5 h 时均已全部死亡, 而生物被膜重悬细菌则分别在 3.5 h 和 4 h 时才全部死亡。

3 讨论

细菌黏附于宿主表面是微生物致病的最初始阶段, 细菌对宿主表面的黏附机制包括特异性和非特异性两种。有关细菌黏附素-受体特异性黏附机制研究报道较多^[20-21], 而对非特异性黏附机制的研究较少。疏水性和生物被膜在细菌非特异性黏附过程中的作用已得到国内外众多学者公认^[1-4]。本研究结果显示, 灿烂弧菌 AP622 为高度疏水性和高生物被膜形成菌株, 进而判断菌株 AP622 具有较强的黏附能力, 这可能是其能够致病的重要因素。

细菌生物被膜有完整的生长周期, 生物被膜的形成是浮游细菌-生物被膜细菌-浮游细菌-生物被膜细菌的循环往复过程。本研究跟踪考察了不同培养时间下生物被膜的形成量, 发现灿烂弧菌 AP622 浮游状态和生物被膜状态相互转化是以 24 h 为 1 个循环周期, 这为养殖生产中抗生素的使用时间提供了理论依据。细菌生物被膜的形成量受多种因素的影响, 包括环境因素和营养因素

表 1 不同菌株的运动性
Tab.1 The motility of different bacteria

菌株 bacterium	运动性 motility		
	泳动 swimming	群集 swarming	颤搐 twitching
灿烂弧菌 <i>Vibrio splendidus</i> (AP622)	-	+	+
灿烂弧菌 <i>Vibrio splendidus</i> (KCTC12679)	-	+	-
哈维弧菌 <i>Vibrio harveyi</i> (ATCC14126)	-	+	+
黄海希瓦氏菌 <i>Shewanella marisflavi</i> (KCCM41822)	-	-	-
鳗弧菌 <i>Vibrio, anguillarum</i> (HUFP5001)	-	-	+
溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i> (KCCM 40513)	-	-	-
副溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (KCTC2471)	+	+	+
河流弧菌 <i>Vibrio fluvialis</i> (KCCM40827)	+	-	+
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> (ATCC29532)	+	+	+

注: “+”表示阳性; “-”表示阴性。
Note: “+” and “-” indicated positive and negative, respectively.

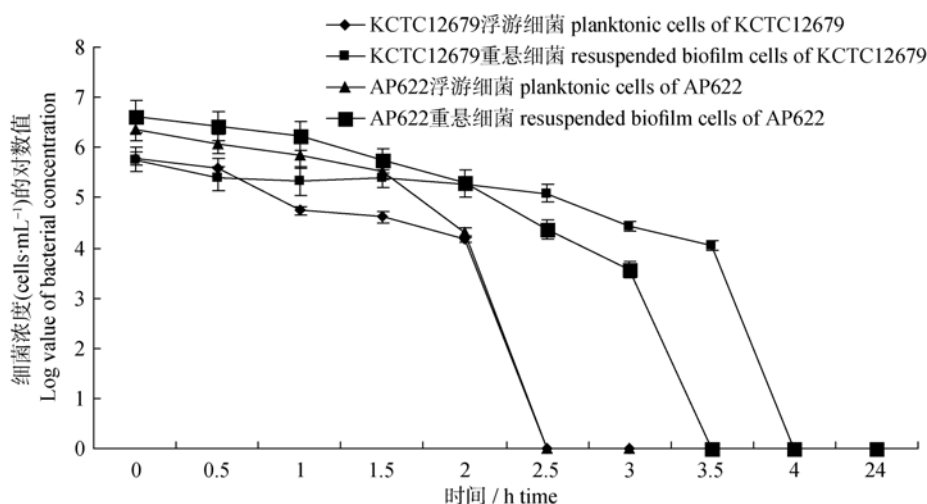


图 3 灿烂弧菌 AP622 和 KCTC 12679 浮游细菌和生物被膜重悬细菌对硫酸庆大霉素的敏感性

Fig.3 Sensitivity of planktonic cells and resuspended biofilm cells of *Vibrio splendidus* AP622 or KCTC 12679 to gentamycin sulphate

等。在对不同黏附材料的研究中, 本研究发现菌株 AP622 在聚氯乙烯和聚苯乙烯上形成的生物被膜较多, 而在玻璃上则形成较少, 这个结果与 Donlan^[22]的观点一致, 微生物易黏附于疏水材料表面, 与亲水材料表面的黏附能力较差。在对不同营养环境的研究中发现, 菌株 AP622 在营养成分丰富的 LB 培养基中生物被膜形成量最多, 在营养成分很低的 CM9 培养基中基本上不形成生物被膜, 这与严岩等^[23]对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和大肠杆菌的研究结果一致。

生物被膜的主要成分是多糖, 葡萄糖可以通过调节生物被膜形成相关基因的表达而影响生物被膜的形成^[24], 菌株 AP622 在 0.5% 的葡萄糖中生物被膜形成量最多, 葡萄糖浓度升高则生物被膜形成量反而降低, 这与靳嘉巍等^[24]对表皮葡萄球菌的研究结果相似。细菌生物被膜的形成除与外界环境因素有关外, 与细菌本身也有重要关系。在细菌形成生物被膜的过程中, 鞭毛和菌毛介导的运动力所起的作用不容忽视。鞭毛介导的趋化运动可以使浮游细菌向有营养物质存在的物质表面或向活的可被附着细胞产生的信号分子方向游动, 能使细菌克服表面张力达到物体表面, 能让黏附的细菌个体从载体表面播散出去; 菌毛通过自聚集在靶组织表面形成微克隆菌群, 即形成生物被膜^[1,5]。在本研究中, 运动力实验结果表

明, 菌株 AP622 均表现出了鞭毛和 IV 型菌毛介导的运动力, 同时菌株 AP622 也是高生物被膜形成株, 进一步证明了菌株运动性和生物被膜的关系。

生物被膜细菌较浮游细菌的突出特点是对抗生素的抵抗性增加, 从而导致治疗困难^[25]。本研究选用了灿烂弧菌有抗菌作用的硫酸庆大霉素^[7], 比较菌株 AP622 以及灿烂弧菌参考菌株各自的浮游细菌和生物被膜重悬细菌对抗生素的 MIC 以及对抗生素的敏感性。结果表明, 灿烂弧菌 AP622 菌株生物被膜重悬细菌的 MIC 是浮游细菌的 32 倍, 而灿烂弧菌参考菌株生物被膜重悬细菌的 MIC 仅是浮游细菌 MIC 的 4 倍, 菌株 AP622 表现出了更为明显的抗药性。目前有关生物被膜细菌耐药机制尚未完全明了, 目前主要归结为 3 方面: 1) 抗生素不能有效穿透生物被膜; 2) 生物被膜内细菌生长速度减慢, 而大多数抗生素对生长活跃的细菌有强烈的杀灭作用, 而处于静止状态的细菌对其具有较强耐药性; 3) 生物被膜细菌的某些基因发生改变, 表现出了一些独特的生理特征^[26]。

综上所述, 菌株 AP622 具有很强的疏水性和高生物被膜形成能力, 进而我们判断其具有很强的黏附力。另外, 由于细菌的生物被膜能不同程度地抵抗药物的作用, 由此导致在养殖实践中菌株 AP622 可能会耐受消毒剂 and 抗生素的作用, 这为病原菌的存活、感染及致病提供了可能性。

参考文献:

- [1] 干霞芳, 李蒙英. 生物膜和生物膜形成菌的研究[J]. 安徽大学学报: 自然科学版, 2007, 31(6): 91-94.
- [2] 侯幼红, 吴绍熙. 微生物细胞表面疏水性与黏附性的研究进展[J]. 国外医学皮肤性病学分册, 1995, 21(2): 83-86.
- [3] Balebona M C, Morinigo M A, Borrego J J. Hydrophobicity and adhesion to fish cells and mucus of *Vibrio* strains isolated from infected fish [J]. Int Microbiol, 2001, 4 (1): 21-26.
- [4] 李艳红, 周学东, 李继遥, 等. 口腔常见致病菌的表面疏水性分析[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2003, 13(12): 684-686.
- [5] Hossain M M, Tsuyumu S. Flagella-mediated motility is required for biofilm formation by *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* [J]. J Gen Pathol, 2006, 72: 34-39.
- [6] 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖仿刺参腐皮综合症病原菌的分离和鉴定[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 118-123.
- [7] Li H, Qiao G, Gu J Q, et al. Phenotypic and genetic characterization of bacteria isolated from diseased cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* in northeastern China [J]. Dis Aquat Org, 2010, 91: 223-235.
- [8] Gatesoupe F J, Lambert C, Nicolas J L. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus* [J]. J Appl Microbiol, 1999, 87, 757-763.
- [9] Gomez-Leon J, Villamil L, Lemos M L, et al. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(1): 98-104.
- [10] 莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 养殖牙鲆鱼苗腹水症病原菌的鉴定及系统发育学分析[J]. 海洋与湖沼, 2003, 34(2): 131-141.
- [11] Vazquez J A, Docasal S F, Miron J, et al. Proteases production by two *Vibrio* species on residuals marine media [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006, 33: 661-668.
- [12] Farto R, Armada S P, Montes M, et al. Presence of a lethal protease in the extracellular products of *Vibrio splendidus*-*Vibrio lentus* related strains [J]. J Fish Dis, 2006, 29, 701-707.
- [13] 孙理云, 陆承平. 2 种猪源链球菌菌体细胞表面疏水性及体外结合纤连蛋白的检测[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(3): 278-280.
- [14] Santos Y, Bandin I, Bruno D W, et al. Comparison of the cell surface hydrophobicity of bacterial fish pathogens by different procedures [C]//Perkins O F, Chen T C. Pathology in Marine Sciences. San Diego: Academic Press, 1990: 101-115.
- [15] Won K M, Park S I. Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea [J]. Aquaculture, 2008, 285: 8-13.
- [16] O'Toole G A, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis [J]. Mol Microbiol, 1998, 28(3): 449-461.
- [17] 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.
- [18] 李彩云, 扶亚祥, 隆雪明, 等. 奥比沙星对水生生物病原菌的体外抑菌作用[J]. 动物医学进展, 2008, 29 (1) : 46-49.
- [19] Walters III M C, Roe F, Bugnicourt A, et al. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin [J]. Antimicrob Agents CH, 2003, 47(1): 317-323.
- [20] 朱兴国, 范红结, 陆承平, 等. 嗜水气单胞菌 JO 1 株粘附素及其受体分析[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25 (2): 82-84.
- [21] Uchimura M, Yamamoto T. Production of hemagglutinins and pill by *Vibrio mimicus* and its adherence to human and small intestines in vitro [J]. Fems Microbiol Lett, 1992, 91 (1): 73-78.
- [22] Donlan R M. Biofilms: microbial life on surfaces [J]. Emerg Infect Dis, 2002, 8(9): 881-890.
- [23] 严岩, 李彤, 刘树林. 两种培养基对铜绿假单胞菌和大肠埃希菌生物被膜厚度的影响[J]. 中国试验诊断学, 2007, 11(5): 613-618.
- [24] 靳嘉巍, 张力, 查锡良, 等. 葡萄糖对表皮葡萄球菌生物被膜形成的影响及调节机制的研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(3): 431-436.
- [25] 常桂娇, 王艾琳. 细菌生物膜及其与细菌耐药性关系的研究进展[J]. 山东医药, 2007, 47(5): 81-82.
- [26] 葛剑平. 生物膜细菌耐药性机制的研究概况[J]. 国外医学口腔医学分册, 2004, 31(5): 351-353.

Cell surface hydrophobicity and biofilm formation ability of *Vibrio splendidus*

LI Hua, WANG Yang, LI Qiang, QIAO Guo

Dalian Ocean University, Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Agriculture, Dalian 116023, China

Abstract: *Vibrio splendidus* infects a range of hosts, including fish, shellfish, and echinoderms. Infection with this pathogen has led to significant economic loss in several cultured species, including the sea cucumber (*Apostichopus japonicus*). Thus, there is an urgent need to understand the pathogenesis of *V. splendidus*. The virulence of a pathogen is partly a function of its adhesion properties. Adhesion depends on cell surface hydrophobicity and biofilm formation. The hydrophobic cell surface provides an advantage to the bacteria *in vivo* by increasing resistance to phagocytosis or by favoring colonization of mucosal or connective tissue in wounds and endocarditis in bacteria. We evaluated the hydrophobicity and biofilm formation in *V. splendidus* AP622, isolated from diseased *A. japonicus*. We also evaluated the effect of culture constituents, culture time, growth medium, and the concentration of glucose on biofilm formation. We compared the sensitivity of planktonic cells and resuspended *V. splendidus* AP622 biofilm cells to gentamycin sulphate. Last, we quantified the motility of the flagellum and measured pill and cell surface hydrophobicity using tests for salt-aggregation (SAT) and microbial adherence to hydrocarbons (MATH). *V. splendidus* AP622 possesses a high ability to form a biofilm. The biofilm formation cycle was 24 h in length and the optimal formation conditions consisted of polyvinyl chloride (PVC) and LB medium with 0.5% glucose. Swarming and twitching motilities played an important role in biofilm formation. The resistance of resuspended biofilm bacteria to antibiotics was significantly higher than in planktonic bacteria ($P < 0.05$). Furthermore, the minimum inhibitory concentration (MIC) was 32 times higher than in planktonic bacteria. *V. splendidus* AP622, exhibiting strong hydrophobicity, could agglutinate at a concentration of 0.6 mol/L ammonium persulfate, and the adhesion partition to liquid hydrocarbons was $>50\%$. In conclusion, the hydrophobicity and biofilm formation properties suggest that *V. splendidus* AP622 has strong adhesion properties. Resistance to antibiotics as a result of biofilm formation will reduce the effectiveness of treatments in aquaculture facilities. Thus, cell surface hydrophobicity and biofilm formation play an important role in the pathogenesis of *V. splendidus*.

Key words: *Apostichopus japonicus*; *Vibrio splendidus*; biofilm; motility; hydrophobicity