



副溶血性弧菌-霍乱弧菌混合生物被膜形成过程研究

董旭日¹, 柴旭锋¹, 檀玲¹, 齐家伟¹, 刘海泉¹, 潘迎捷^{1,2,3}, 赵勇^{1,2,3*}

¹上海海洋大学食品学院, 上海 201306

²农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306

³上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

摘要:【目的】研究副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)和霍乱弧菌(*Vibrio cholera*, VC)混合生物被膜的形成过程。【方法】在 4、8、12、24、36、48、60、72 h 测定单独条件下 VP、VC 及其混合后生物被膜的形成情况, 通过结晶紫染色法、平板菌落计数法、测定胞外多糖、胞外蛋白, 通过荧光原位杂交(FISH)观察混合生物被膜形成。【结果】虽然形成的混合生物被膜量介于 VC 和 VP 之间, 但混合生物被膜在形成过程中, 成熟期后生物被膜量的变化较小, 对环境的抗性增强。混合生物被膜中拥有更多的活菌, 混合生物被膜形成过程中胞外蛋白和胞外多糖的变化体现出其可能在对抵御不适应环境中起重要作用, 通过 FISH 可观察到不同时期生物被膜的变化过程。【结论】VC 与 VP 共同形成生物被膜的过程中, 混合生物被膜总量虽然减少, 但混合生物被膜中拥有更多的活菌, 这可能引起更大的危害。研究混合生物被膜形成过程中被膜的变化, 可为有害生物被膜的控制提供基础。

关键词: 副溶血性弧菌, 霍乱弧菌, 混合生物被膜, 荧光原位杂交

细菌生物被膜(bacterial biofilm)是许多细菌粘附在生物或非生物表面后, 分泌胞外多糖(EPS)、蛋白质、脂质和 DNA 等复合物, 并将细菌包裹其中而形成的膜状物, 是细菌为了适应自然环境、利于自身生存的一种存在形态^[1-2]。普遍认为生物被膜的形成一共经历了 3 个阶段: 粘附期、发展期和成熟期。这 3 个阶段中, 生物被膜经历了从

浮游态到结构化, 从低密度到高密度的过程^[3]。自然界中 90%以上的细菌都能形成生物被膜^[4], 人类细菌性感染约有 65%是由生物被膜引起的^[5]。

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种常见的食源性致病菌, 由于人们食用未烧熟煮透的食物或者烹调后的食品重新受到污染^[6-7]。尤其在夏秋季节, 因误食被致病性 VP 污染的海产

基金项目: 国家自然科学基金(31571917, 31671779); 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字 2015 第 4-8 号, 2016 第 1-1 号, 沪农科推字(2017)第 4-4 号]; 上海市“曙光计划”(15SG48); 上海市教育委员会科研创新计划资助(2017-01-07-00-10-E00056)

*通信作者。Tel: +86-21-61900503; E-mail: yzhao@shou.edu.cn

收稿日期: 2017-12-28; 修回日期: 2018-03-22; 网络出版日期: 2018-05-28

品而引发的急性肠胃炎、原发性败血症等疾病时有发生,对食品安全构成了巨大威胁。霍乱弧菌(*Vibrio cholera*, VC)是引起霍乱的病原菌,可引起严重的腹泻,从而引起身体严重脱水甚至死亡^[8]。在世界上曾引起多次暴发流行,给人们的生命财产造成巨大的损失。副溶血性弧菌和霍乱弧菌常常在海产品中生存,并能在海产品表面形成混合生物被膜,容易引起食品交叉污染,导致食品腐败或疾病传播的隐患,给食品安全带来极大威胁。

实际生产中,混合被膜污染严重影响着食品生产与安全。混合生物被膜同单菌种形成的生物被膜相比,由于其菌种组成的多样性,对环境具有更好的适应力^[9]。生物被膜中的微生物,其代谢速率较低且一些细胞处于休眠状态,这使得生物被膜难以被清除,并且当其中生物被膜脱离时,可能产生交叉污染。对食品安全带来了巨大的危害^[10]。现在大部分有关生物被膜的研究主要集中在单一物种生物被膜,然而从自然界中生物被膜的微观结构发现,许多生物被膜不只是单一物种形成的,而包含有多物种之间相互作用形成的更复杂的生物被膜,进而影响这些群体的繁殖、结构和功能^[11]。因此,近年来,人们的研究热点逐渐从单一细菌生物被膜转变为混合生物被膜的复杂性和细菌之间的交流^[12-13]。本文通过研究副溶血性弧菌和霍乱弧菌形成的混合生物被膜形成过程,从而为食品加工环境对有害微生物被膜的有效控制鉴定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌种:本实验中采用菌株:副溶血性弧菌标准菌株 ATCC 17802;霍乱弧菌 GIM1.449。

1.1.2 培养基:硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼

脂培养基(TCBS)、胰酶大豆肉汤培养基(TSB)、NaCl 等,北京陆桥技术有限责任公司;弧菌显色培养基,上海欣中生物工程有限公司。

1.1.3 试剂及仪器:结晶紫,美国 Sigma 公司;磷酸缓冲液(PBS),上海诺伦生物医药技术有限公司;SYBR Green I 染料,北京索莱宝科技有限公司;25%戊二醛溶液,上海展云化工有限公司;24 和 96 孔板,美国康宁公司;BioTek 酶标仪,美国伯腾仪器有限公司;MIR154 高精度低温培养箱、MLS-3750 型高压灭菌锅,日本三洋电机生物医药株式会社;OptiMair[®]垂直流超净工作台、Airstream[®]A2 型二级生物安全柜,Esco China 公司;LSM710 型激光扫描共聚焦显微镜,德国卡尔蔡司公司。DNA 细菌原位杂交通用试剂盒[含 Solution A、Solution B、细菌杂交液、细菌杂交 Washing Buffer(10×)],广州市外显子生物技术有限公司;VC 探针、VP 探针购自广州市外显子生物技术有限公司。

1.2 菌种活化

将副溶血性弧菌和霍乱弧菌分别接种于 TCBS 琼脂,37 °C 过夜培养,挑单菌落至含 1% NaCl 的 5 mL 的 TSB 液体培养基,在 37 °C、180 r/min 的摇床过夜培养,连续活化 2 次至 $OD_{600}=0.6$,作为接种液备用。

1.3 生物被膜的制备

将上述所得种子液用 TSB 按 1:100 的比例进行稀释,另取副溶血性弧菌和霍乱弧菌种菌液按 1:1 比例混合,并用 TSB 按 1:100 的比例进行稀释。将上述菌液分别取 1 mL 稀释后的菌液置于 24 孔板中 25 °C 培养。分别培养 4、8、12、24、36、48、60、72 h。

1.4 结晶紫染色

参照文献[14],将上述 24 孔板中培养液移除,

加入 1 mL 磷酸缓冲液每孔清洗 3 次, 去除浮游菌体。室温干燥 10 min。加入 1 mL 0.1% (W/V) 的结晶紫染液。室温下染色 30 min。用 1 mL 磷酸缓冲液每孔清洗 3 次, 置于 60 °C 烘箱, 干燥 30 min。然后加入 1 mL 95% 乙醇, 检测其在 600 nm 条件下的吸光值(OD_{600}), 以新鲜 TSB 培养基为阴性对照, 每个实验重复 3 次。

1.5 平板菌落计数

在无菌操作台中, 将 1.3 中 24 孔板中的上清液移除, 参考文献[15], 加入 1 mL 磷酸缓冲液清洗, 每孔清洗 3 次, 去除浮游菌体。加入 1 mL 0.85% 的 NaCl, 用枪头将附着在 24 孔板底部的生物被膜刮起, 并反复吹打混匀, 取 0.5 mL 混匀的菌液加入 4.5 mL 已灭菌的 0.85% 的 NaCl 溶液中, 用振荡器振荡混匀。制成 10^{-1} 的被膜菌液。在从 10^{-1} 的被膜混合菌液中取 0.5 mL 加入 4.5 mL 已灭菌的 0.85% NaCl。制成 10^{-2} 的稀释被膜菌液。并以此依次制成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的稀释菌液。再分别从 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 的稀释菌液中取 100 μ L 涂布 TCBS 固体培养基, 每个稀释浓度涂布 3 个平板作为试验平行。在 37 °C 倒置培养 24 h 后进行菌落计数。

1.6 生物被膜中胞外多糖和胞外蛋白的测定

将 1.2.2 培养后的 24 孔板中的菌液吸出至 96 孔板, 参照文献[16]用酶标仪测定其 OD_{595} , 加入 1 mL 磷酸缓冲液清洗, 每孔清洗 3 次, 去除浮游菌体。然后向 24 孔板中加入 1 mL 0.01 mol/L 的氯化钾溶液。用枪头将附着在 24 孔板底部的生物被

膜刮起, 并反复吹打混匀。超声处理(每次 5 s, 间隙 5 s, 循环 5 次)。4 °C 下 4000 \times g 离心 20 min。0.22 μ m 滤膜过滤。加 200 μ L 浓硫酸至滤液, 静置 30 min 后加 25 μ L 苯酚溶液(6%)。90 °C 静置 5 min, 测定 OD_{490} , 样品多糖相对含量为 OD_{490}/OD_{595} 。吸取 40 μ L 滤液于 1.5 mL 无菌离心管内, 加入 200 μ L lowry reagent 溶液室温静置 10 min。然后加入 20 μ L 福林-酚溶液, 室温静置 30 min。最后测定 750 nm 处的光吸收值, 比值 OD_{750}/OD_{595} 即为样品胞外蛋白的相对含量。

1.7 荧光原位杂交(FISH)法观察 VP 和 VC 混合生物被膜

根据霍乱弧菌和副溶血性弧菌 16S rRNA 基因序列分别设计 VC 探针和 VP 探针。探针信息如表 1。

将 1.3 中培养后的被膜中的上清液吸出, 参考文献[17], 加入 1 mL 磷酸缓冲液清洗, 每孔清洗 3 次, 去除浮游菌体。在 4% 的多聚甲醛溶液中固定 3 h, 然后用 PBS 溶液洗 2-3 次。用预冷的 PBS 清洗被膜 2-3 次除去剩余的多聚甲醛。将 Solution A 滴加在标本上, 室温静置 20 min; 吸去 Solution A, 滴加 Solution B, 室温静置 15 min; 吸去 Solution B, 在 PBS 溶液中浸泡 10 min; 在标本上滴加约 200 μ L Hybridization Buffer, 置于湿盒中, 于恒温箱 55 °C 预杂交 2 h, 预杂交快结束时, 将探针与 Hybridization Buffer (25% 杂交液) 按以下比例稀释: VC 探针 3 μ L: VP 探针 3 μ L: Hybridization Buffer (25% 杂交液) 150 μ L。混合均匀后, 88 °C 变性 3 min, 37 °C 平衡 5 min; 预杂交结束后, 吸去

表 1. 荧光原位杂交探针序列

Table 1. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) probe sequence

Probe names	Probe sequences (5'→3')	Labeling group	Marker color
VP probe	ACTTTGTGAGATTCGCTCCACCTCG	FITC	Green
VC probe	TGCAATTCAGGTTGAGCCCCG	CY3	Red

Hybridization Buffer, 滴加 15–30 μL 平衡后的探针, 盖上盖玻片, 用 Rubber Cement 封片, 37–42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 16–72 h; 避光条件下洗涤, 将细菌杂交 Washing Buffer (10 \times)与蒸馏水按 1 : 9 混合均匀, 配成工作液, 揭去 Rubber Cement, 将玻片放入 Washing Buffer I 工作液, 3–5 min 后, 盖玻片会自动脱落, 再将玻片移至新的 Washing Buffer I 工作液(预热至 60 $^{\circ}\text{C}$), 洗涤 2 min, 再移到室温的细菌杂交 Washing Buffer II (10 \times)工作液, 洗涤 15 min; 依次浸入 70%、85%、100%乙醇中各脱水 2 min, 室温干燥; 滴加 20 μL DAPI Anti-fade solution, 盖上盖玻片后, 暗处静置 15 min 后, 荧光显微镜下观察。

1.8 数据处理

采用 Origin 8.0 软件处理, 并对相关数据进行统计分析。

2 结果和分析

2.1 通过结晶紫染色法观察副溶血性弧菌和霍乱弧菌混合生物被膜形成过程

利用结晶紫染色法观察副溶血性弧菌和霍乱弧菌生物被膜形成的变化过程, 测量 600 nm 条件下的吸光度, 以吸光度值的高低反映生物被膜形成量的变化。结果如图 1 所示, 在 4–12 h 黏附期, 无论单独培养的 VP、VC 还是 VP、VC 的混合菌, 测量所得的 OD_{600} 值都在迅速增长, 这一阶段的细菌处于细菌生长曲线的指数期。指数期的微生物在生长曲线上活菌数直线上升, 细菌以稳定的几何级数极快增长。细菌形成生物被膜的量随着细菌生长而增加。在 12–48 h 成熟发展期, 随着细菌的生长繁殖, 营养物质的消耗和有害代谢废物的积累使细菌形成生物被膜的增速减缓, 并于 24 h 时达到峰值。在 24–48 h, 随着 24 孔板中营养物

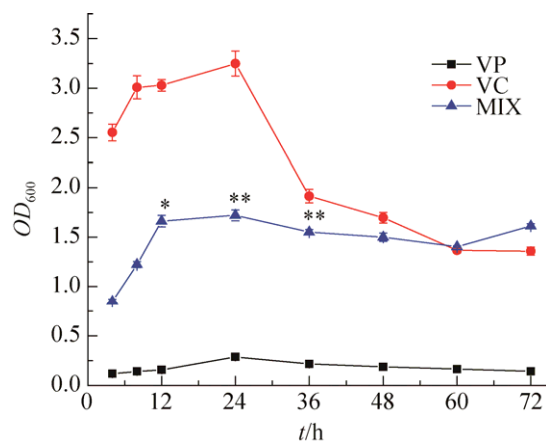


图 1. 副溶血性弧菌(VP)和霍乱弧菌(VC)结晶紫染色下生物被膜的形成过程

Figure 1. Biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus* (VP) and *Vibrio cholerae* (VC) under the crystal violet stain.

质的消耗和有害代谢废物的积累, 使得环境不利于生物被膜的形成, 从而使生物被膜的形成量减少。48–72 h 播散期, 营养物质的减少和有害代谢废物的积累, 使得环境条件变得不利于微生物生存, 生物被膜持续减少。

如图 1 所示, 同单独培养条件下相比, VC 和 VP 的混合菌形成的生物被膜介于形成生物被膜能力极强的 VC 和形成生物被膜能力较弱的 VP 之间。在单培养时, 霍乱弧菌在 24–36 h 生物被膜的量急剧减少, 表明其受环境变换的影响较大。混合生物被膜同单培养的 VC 生物被膜相比在 24–36 h 时生物被膜的量具有显著性差异($P < 0.01$)。表明在 VC 与 VP 共同形成生物被膜的条件下, VC、VP 形成的混合生物被膜对不利环境的抗性增强。

2.2 混合菌与单一菌生物被膜活菌数的变化

使用弧菌显色培养基测量 VP 和 VC 混合生物被膜中的活菌数时, VP 形成的菌落为紫红色; VC 形成的菌落为蓝绿色。根据菌落颜色的不同, 可以将混合生物被膜中的 VP 和 VC 分别计数, 结果如图 2 所示。同单培养的 VC 相比, 在 24 h 前混

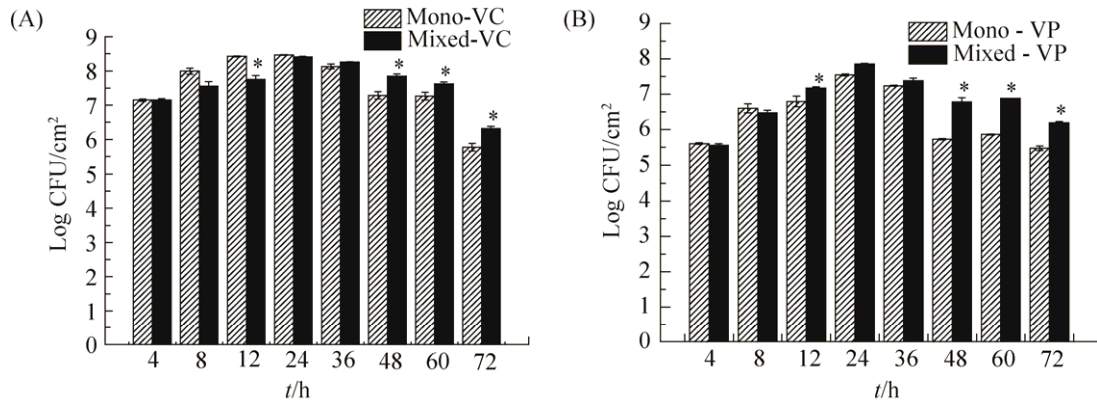


图 2. 混合生物被膜中活菌数的变化

Figure 2. Changes in the number of living bacteria in the mix biofilm. A: the change of viable cells in biofilms of VC strains under single and mixed culture conditions. B: the change of viable cells in biofilms of VP strains under single and mixed culture conditions.

合生物被膜中 VC 的活菌数比单培养的 VC 被膜中的活菌数要少 ($P < 0.05$)；在 24 h 后混合生物被膜中 VC 的活菌数比单培养条件下 VC 生物被膜中的活菌数多 ($P < 0.05$)。这表明当 VC 与 VP 混合培养形成的生物被膜同单培养 VC 形成的生物被膜相比，混合生物被膜中的 VC 活菌在成熟期有着更多的活菌，从而有更大的危害性。而混合被膜中的 VP 活菌数一直比单培养被膜中的 VP 活菌数多 ($P < 0.05$)，这表明 VC 可能促进 VP 的生长。在成熟发展期后。培养条件逐渐不适于微生物的生存。此时被膜中的微生物活菌数开始减少。但是混合生物被膜中的活菌数都比单培养的被膜中的活菌数多。这表明混合生物被膜中的 VP 和 VC 比单培养条件下有了更强的抗逆性，从而使其危害性可能增高。

虽然我们用结晶紫测得混合生物被膜中被膜的总量介于 VC 和 VP 单培养生物被膜之间，但是同分别培养 VP 和 VC 相比，混合生物被膜中拥有更多的活菌。表明了 VP 和 VC 形成的混合被膜同 2 种细菌单培养条件下的生物被膜相比能对人类

健康产生更大的安全威胁。

2.3 生物被膜形成过程中胞外多糖和胞外蛋白的变化

胞外物质不仅能增强微生物细胞对外界环境因素的抵抗能力，而且在细胞初始粘附及维持生物被膜稳定中起着关键作用。胞外多糖和胞外蛋白相对含量的变化如图 3 所示。在 4–24 h 时，无论单独培养的 VP、VC 还是 VP、VC 的混合菌，测量所得的都在增长，因为细菌生物被膜主要物质是胞外多糖和胞外蛋白等，在生物被膜形成过程中对生物被膜的形成有重要作用。36 h 细菌胞外多糖和胞外蛋白仍会继续增加并达到最大值 ($P < 0.01$)，可能是由于细菌在此时期，营养物质的消耗和有害代谢废物的积累使生物被膜中的活菌分泌更多胞外多糖胞外蛋白等物质来抵御逐渐不适合其生存的环境。36–72 h 生物被膜中胞外多糖和胞外蛋白的量逐渐减少，由于环境条件变得不利于微生物生存，生物被膜量减少，引起胞外蛋白和胞外多糖量的减少。

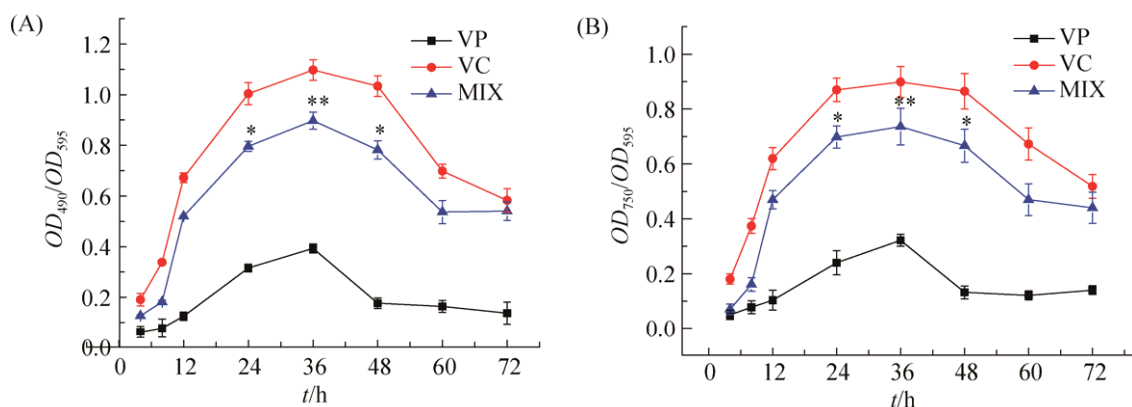


图 3. 副溶血性弧菌(VP)和霍乱弧菌(VC)胞外多糖和胞外蛋白相对含量的变化

Figure 3. Changes of relative content of extracellular polysaccharide in *Vibrio parahaemolyticus* (VP) and *Vibrio cholerae* (VC). A: the relative content of extracellular polysaccharides in the biofilms of VC, VP and their mixed bacteria. B: the relative content of extracellular proteins in the biofilms of VC, VP and their mixed bacteria.

2.4 FISH 法观察副溶血性弧菌和霍乱弧菌混合生物被膜

VC、VP 混合生物被膜的荧光原位杂交结果如图 4 所示。在 4 h 时红色荧光的 VP 较少、聚集较少，绿色荧光的 VC 较多且开始聚集；在 8 h 呈红色的荧光 VP 较多且开始聚集成片；在 12 h 红色荧光的 VP 生物被膜将生物被膜表面完全覆盖，绿色荧光的 VC 生物被膜也在逐渐增加。在 24–36 h，

绿色荧光的 VC 与红色荧光的 VP 共同形成紧密结合的生物被膜。36 h 后混合生物被膜表面混合生物被膜逐渐减少。荧光原位杂交表明，VC、VP 混合生物被膜形成过程中，24 h 前主要由形成生物被膜能力较弱的 VP 包裹 VC 形成生物被膜；24 h 后，随着环境条件逐渐不适应微生物生存，生物被膜的量逐渐开始减少，生物被膜逐渐解体。

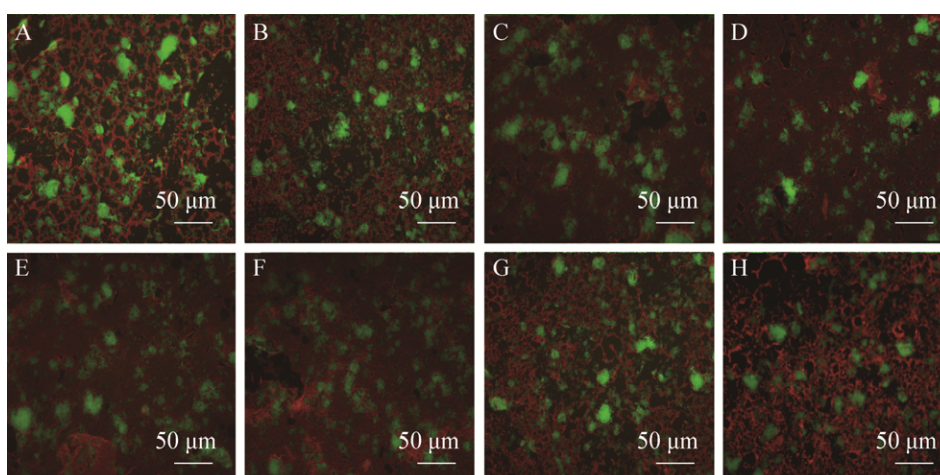


图 4. 荧光原位杂交观察混合生物被膜的形成过程

Figure 4. Formation of mixed biofilms was observed by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). VP: red; VC: green; a–h respectively mixed strain 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h and 72 h.

3 讨论

同浮游态的微生物相比,生物被膜中的微生物生长相对较慢^[18]。这可能是因为在生物被膜中的微生物获得营养物质和氧气受限^[19]。种间的相互作用在混合生物膜的形成和发展中发挥关键作用^[20]。陈东等的研究表明,大肠杆菌 O157:H7 和沙门氏菌形成的混合被膜也是介于两种细菌单培养被膜量之间^[21]。Granillo 对曲霉、金黄色葡萄球菌形成混合生物被膜也有类似的结果^[22]。Shahryar 等的研究表明不动杆菌在同放线杆菌、布兰汉氏球菌、芽孢杆菌、微球菌形成混合生物被膜时,虽然形成的生物被膜量有所减少,但是黏附能力和耐药性有所增加^[23]。在本研究中,VC、VP 形成的混合生物被膜同单培养 VC 形成的生物被膜形成量有类似的变化,单其黏附力与抗药性的变化后续可进一步研究。Katherine 等的研究表明妥布霉素处理的铜绿假单胞菌对星座链球菌生物被膜的形成有促进作用^[24]。Ren 的研究表明在混合生物被膜中的寡养单胞菌、黄单胞菌、氧化微杆菌、解淀粉类芽孢杆菌同单培养的生物被膜中的菌相比,混合生物被膜中活菌的含量更多^[25]。生物被膜在形成过程中胞外多糖和胞外蛋白随着时间的变化表明,在生物被膜形成过程中胞外多糖和胞外蛋白起重要作用。

本文研究 VP 和 VC 形成单培养和混合生物被膜的过程,结果表明 VP 和 VC 形成的单培养和混合生物被膜是一个动态的变化的过程,在 24 h 时混合生物被膜的形成能力最强。研究发现混合生物被膜虽然总的被膜量相对于 VC 单培养的细胞有所减少,但是却含有更多的活细菌;同单培养的生物被膜相比,混合生物被膜可能会引起更大的危害。测定胞外多糖和胞外蛋白的结果表明,

生物被膜形成过程中胞外蛋白和胞外多糖变化同单培养 VC 生物被膜变化趋势类似。在 36 h 生物被膜中胞外多糖和胞外蛋白达到最大值。表明胞外蛋白和胞外多糖在生物被膜抵抗不利环境中可能起重要作用。荧光原位杂交(FISH)观察混合生物被膜形成的结果可以观察混合生物被膜形成过程中两种菌的变化过程。通过了解混合生物被膜的变化过程,我们可以为有效控制 VP 和 VC 混合生物被膜引起的食品污染奠定基础。另外,可以通过进一步研究 VP 和 VC 混合生物被膜形成过程中的基因表达调控,从而更加深入理解微生物在生物被膜中通过何种分子机制互作。

参考文献

- [1] Costerton JW. Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1999, 11(3/4): 217–221.
- [2] Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 2002, 56: 187–209.
- [3] 周文渊. 牛奶介质中混合菌生物被膜形成特性及其抑制的研究. 广东工业大学硕士学位论文, 2014.
- [4] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, 284(5418): 1318–1322.
- [5] Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*, 1999, 283(5409): 1837–1839.
- [6] Tian MS, Zheng LJ, Peng SJ, Li J, Zhang L, Qi LB, Zhao YX. Analysis and measures on collective food poisoning caused by vibrio parahaemolyticus in shanghai munidpality during 2000–2007. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2008, 20(6): 514–517.
田明胜, 郑雷军, 彭少杰, 李洁, 张磊, 戚柳彬, 赵宇翔. 2000—2007年上海市副溶血性弧菌致集体性食物中毒分析及对策. *中国食品卫生杂志*, 2008, 20(6): 514–517.
- [7] Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, Altekruze S, Ray B, Hammond RM, Slutsker L, Thompson S, Wilson S, Bean N H, Griffin PM, Slutsker L. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973–1998. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181(5): 1661–1666.
- [8] Kierek K, Watnick PI. Environmental determinants of *Vibrio*

- cholerae* biofilm development. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5079–5088.
- [9] Joo HS, Otto M. Molecular basis of *in vivo* biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(12): 1503–1513.
- [10] Rode TM, Langsrud S, Holck A, Mørseth T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 116(3): 372–383.
- [11] Jass J, Roberts SK, Lappin-Scott HM. Microbes and enzymes in biofilms//Burns RG, Dick RD. Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications. New York, USA: Marcel Dekker Inc., 2002: 307–326.
- [12] Momeni B, Briley KA, Fields MW, Shou W. Correction: Strong inter-population cooperation leads to partner intermixing in microbial communities. *Elife*, 2014, 3: e029645.
- [13] Zengler K, Palsson BO. A road map for the development of community systems (CoSy) biology. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(5): 366–372.
- [14] Chopra L, Singh G, Jena KK, Sahoo DK. Sonorensin: a new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13412.
- [15] Harwood VJ, Gandhi JP, Wright AC. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 59(3): 301–316.
- [16] Nguyen D. Studying regulation of a virulence factor in *Vibrio cholerae* using genetic reporter assays and hybridization chain reaction: fluorescent *in situ* hybridization (HCR-FISH) to label bacterial mRNA in drosophila. *Amherst College Doctoral Dissertation*, 2017.
- [17] Kim HS, Park HD. Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *PLoS One*, 2013, 8(9): e76106.
- [18] Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO Journal*, 2000, 46(6): S47–S52.
- [19] Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 2001, 33(8): 1387–1392.
- [20] O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews of Microbiology*, 2000, 54(1): 49–79.
- [21] Chen D, Zhao T, Doyle MP. Single- and mixed-species biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella*, and their sensitivity to levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate. *Food Control*, 2015, 57: 48–53.
- [22] Granillo AR, Canales MGM, Espíndola MES, Rivera MAM, De Lucio VMB, Tovar AVR. Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed *in vitro* by mixed biofilm formation. *BMC Microbiology*, 2015, 15(1): 33.
- [23] Shakeri S, Kermanshahi RK, Moghaddam MM, Emtiazi G. Assessment of biofilm cell removal and killing and biocide efficacy using the microtiter plate test. *Biofouling*, 2007, 23(1/2): 79–86.
- [24] Price KE, Naimie AA, Griffin EF, Bay C, O'Toole GA, DiRita VJ. Tobramycin-treated *Pseudomonas aeruginosa* PA14 enhances *Streptococcus constellatus* 7155 biofilm formation in a cystic fibrosis model system. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(2): 237–247.
- [25] Ren DW, Madsen JS, Sørensen SJ, Burmølle M. High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *The ISME Journal*, 2015, 9(1): 81–89.

Dynamic biofilm forming process of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholera*

Xuri Dong¹, Xufeng Chai¹, Ling Tan¹, Jiawei Qi¹, Haiquan Liu¹, Yingjie Pan^{1,2,3}, Yong Zhao^{1,2,3*}

¹ College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

² Safety Risk Assessment Laboratory of Aquatic-Product Processing & Preservation, Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China

³ Engineering Research Center of Food Thermal-Processing Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: [Objective] We studied the formation of a mixed biofilm formed by *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. [Methods] Biofilm formation was quantified using crystal violet staining, abundance of extracellular polysaccharide and extracellular protein, fluorescence *in situ* hybridization and colony plate count. Biofilms formed by individual and mixed strains were determined from the start and the following intervals at 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h. [Results] The amount of biofilm produced by the mixed strains was less than the total amount of biofilm produced by the individual strains, indicating there was no synergism between the strains. However, in the mixed biofilm the time of maturation was increased, the stability of the biofilm to external perturbation was enhanced and the cell density was higher. [Conclusion] The biofilm formed by a mixed population of *V. parahaemolyticus* and *V. cholera* is therefore more persistent and can potentially pose a greater risk for recontamination and subsequent development of disease.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholera*, mixed biofilm, fluorescence *in situ* hybridization

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31571917, 31671779), by the Key Project of Shanghai, Agriculture Prosperity through Science and Technology [G20150408, G20160101, T20170404], by the “Dawn” Program of Shanghai Education Commission (15SG48) and by the Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (2017-01-07-00-10-E00056)

*Corresponding author. Tel: +86-21-61900503; E-mail: yzhao@shou.edu.cn

Received: 28 December 2017; Revised: 22 March 2018; Published online: 28 May 2018