



## 冷激条件下预形成副溶血性弧菌生物被膜的发展变化

俞文英<sup>1</sup>, 韩乔<sup>1</sup>, 宋雪迎<sup>1</sup>, 刘海泉<sup>1,2,3</sup>, Pradeep K Malakar<sup>1</sup>, 潘迎捷<sup>1,2,3</sup>, 赵勇<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>上海海洋大学食品学院, 上海 201306

<sup>2</sup>上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

<sup>3</sup>农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306

**摘要:**【目的】生物被膜可附着在食品或医药生物材料表面引起持续性的感染, 而现今极少有关于温度变化对预形成生物被膜影响的研究。本文分析了冷激条件下副溶血性弧菌预形成生物被膜的发展变化。【方法】以改进的结晶紫染色法检测生物被膜总量, 以改进的超声法和 Lowry 法量化胞外多糖和蛋白质, 以 RNA 试剂盒提取并纯化生物被膜形成的相关基因。同时, 激光共聚焦扫描显微镜直观显示了冷激条件下预形成生物被膜形态结构的变化, 并深入分析了生物被膜结构的变化, 以及生物被膜结构参数和基因转录的相关性。【结果】在冷激条件下, 副溶血性弧菌生物被膜总量增加, 同时, 副溶血性弧菌预形成的生物被膜胞外多聚物的主要成分胞外多糖和蛋白质也逐渐增加, 被膜形成相关鞭毛基因和毒力基因的转录活跃。生物被膜的平均厚度(MT)、平均扩散距离(ADD)、孔隙率(P)、生物被膜粗糙度(BR)和均匀性(H)在冷激过程中也发生了变化, 同时这些参数之间存在显著相关性( $P < 0.01$ ), 而生物被膜结构参数与生物被膜相关基因转录的相关性较弱( $P < 0.05$ )。【结论】因此, 4 °C 和 10 °C 冷激不能完全抑制副溶血性弧菌预形成生物被膜的生长, 风险评估人员在制定控制食源性感染风险的战略时应考虑到这一因素。

**关键词:** 冷激, 预形成生物被膜, 副溶血性弧菌, 被膜相关基因的转录, 被膜结构

生物被膜是一种多细胞复合物, 由聚集在材料表面并嵌入在胞外多聚物(EPS)中的微生物形成<sup>[1]</sup>。多糖和蛋白质是生物被膜胞外多聚物的主要成分, 其中多糖能将成熟生物被膜中的细胞凝聚

在一起, 维持生物被膜结构的完整性<sup>[2]</sup>。生物被膜是微生物附着的一种重要方式, 在微生物的生命周期中起了很大的作用<sup>[3]</sup>。与非被膜态的菌株相比, 被膜态的微生物对消毒剂 and 抗生素有更强的

基金项目: 国家自然科学基金(31671779, 31571917); 国家重点研发计划资助(2018YFC1602200, 2018YFC1602205); 上海市科技兴农项目(沪农科推字 2017 第 4-4 号); 上海市教育委员会科研创新计划(2017-01-07-00-10-E00056); 上海市教委曙光计划(15SG48)

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

收稿日期: 2019-03-03; 修回日期: 2019-06-03; 网络出版日期: 2019-10-17

抵抗能力<sup>[4]</sup>。

副溶血性弧菌是一种嗜盐、革兰氏阴性、弯曲杆状的细菌,广泛分布于水库、水塘中<sup>[5]</sup>,常从各类水产品中分离出来,特别是贝类<sup>[6]</sup>,并附着在食品或者食品接触材料的表面而形成生物被膜。副溶血性弧菌是引起许多亚洲国家食用水产品后致病的主要病原菌<sup>[7]</sup>。细菌群体感应(quorum sensing, QS)、鞭毛、III型分泌系统(type three secretion system, T3SS)、热稳定性直接溶血素(thermostable direct hemolysin, TDH)和热不稳定溶血素(thermolabile hemolysin, TRH)的产生与副溶血性弧菌生物被膜的形成密切相关。QS是一种细菌细胞与细胞之间的交流过程,由信号分子自体诱导物介导<sup>[8]</sup>,是细菌生物被膜形成的必要条件。鞭毛基因的转录有助于鞭毛的生长,鞭毛对于细菌附着在材料表面的过程至关重要。此外,III型分泌系统(T3SS1和T3SS2)基因的转录、TDH和TRH的基因转录与生物被膜的增加相关<sup>[9]</sup>。

副溶血性弧菌的暴发、生物被膜的形成均与温度有很大的相关性<sup>[10]</sup>。非被膜态的副溶血性弧菌在低于10℃的温度下,生长速率变慢或者极少生长<sup>[11-12]</sup>,因此,4℃和10℃低温通常被用于商业海产品的运输、零售和加工。Han等<sup>[13]</sup>研究发现副溶血性弧菌能在4℃和10℃形成单层生物被膜,而且这些生物被膜和高温下(15-37℃)形成的生物被膜明显不同。宋雪迎等<sup>[14]</sup>研究发现温度可通过影响胞外多糖和蛋白来影响生物被膜的形成。低温条件下(4℃和15℃),无论是胞外多糖还是胞外蛋白分泌量都显著低于25℃和37℃。低温抑制了EPS的产生,从而抑制了生物被膜的形成。然而,根据以往对副溶血性弧菌耐冷性的研究,冷链是维持食品质量和安全的重要措施<sup>[15]</sup>,但当水产品暴露在高温(15-37℃)下一

定的时间后,允许食源性致病菌产生预形成生物被膜,冷链运输和低温保存则不能有效控制细菌,这是一个潜在的食品安全风险。目前,关于低温下预形成生物被膜的研究却非常少,甚至空缺。

本研究从两个方面探究了在37℃条件下培养24h得到的生物被膜(预形成生物被膜)<sup>[14]</sup>从37℃转向4℃或10℃低温条件下的变化。一方面,预形成生物被膜生物量、EPS含量的变化以及生物被膜相关基因的转录直接说明了低温条件无法完全抑制预形成细菌生物被膜的生长。另一方面,共聚焦激光扫描显微镜(CLSM, Confocal laser scanning microscopy)图像显示了生物被膜形态结构的变化,相关性分析表明了生物被膜结构参数与生物被膜相关基因之间的内在关系。本研究也为今后食品工业冷藏水产品的安全提供了理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和引物:**副溶血性弧菌(ATCC17802),购于中国科学院微生物研究所;引物见表1,由Primer Premier 5.0软件设计,均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**1.1.2 培养基与试剂:**硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂(TCBS)和胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB)购于北京陆桥技术有限责任公司;20×磷酸缓冲液(PBS)、50%戊二醛和SYBR Green I染料购于上海生工生物技术有限公司;氯化钾(KCl)购于国药集团化学试剂(上海)有限公司;结晶紫、Lowry试剂和福林酚试剂均购自美国Sigma公司;RNA试剂盒购于上海捷瑞生物工程有限公司;反转录试剂盒购于TaKaRa公司。

表 1. RT-qPCR 引物序列  
Table 1. Primer sequences of the RT-qPCR assay

Genes	Primer sequences (5'→3')	References
16S rRNA	F-GTTGGTGAGGTAAGGGCTCA R-GCTGATCATCCTCTCAGACCA	[23]
<i>pilA</i>	F-TGACGAAGAATCGTGGAGAGGTT R-CGATTATCGGCGTTTTGGCTG	[24]
<i>aphA</i>	F-ACACCCAACCGTTCGTGATG R-GTTGAAGGCGTTGCGTAGTAAG	[23]
<i>opaR</i>	F-TGTCTACCAACCGCACTAACC R-GCTCTTTCAACTCGGCTTCAC	[25]
<i>Trh</i>	F-TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT R-CATAACAAACATATGCCATTTC	[26]
<i>vcrD1</i>	F-AAGGTAGGGCAACGCAAAGA R-AGCAGCACGACAGCAATACT	GenBank database
<i>vopS</i>	F-TAGAACGCGATTACCGTGGG R-TTACCGAGGTCTTTGTCCGC	GenBank database
<i>vopD1</i>	F-GCGGGTGCAGTAAAAAGCAA R-AAGCTCACCCATCAGGTTTCG	GenBank database
<i>vcrD2β</i>	F-AGAGAGTTTGGGGACAAGCG R-CCTTCAGCCGAGCTTTGAGA	GenBank database
<i>vscC2β</i>	F-CAGTGAAGGCCATCGTCAGA R-GGGCGTTCCTCGAACTAACA	GenBank database
<i>vopP2β</i>	F-AGAAGGCGGGGTAAATGCT R-ACCTCCGCAACCTAAGTTCA	GenBank database

Flagella gene (*pilA*), QS gene (*aphA*, *opaR*), TRH gene (*Trh*), T3SS (*vcrD1*, *vopS*, *vopD1*, *vcrD2β*, *vscC2β*, *vopP2β*).

**1.1.3 主要试验设备：**24 孔板、0.22 μm 膜滤器购于上海生工生物技术有限公司；超声波仪 (JY92-IIN) 购于宁波新芝生物技术有限公司；激光共聚焦扫描显微镜 LSM710-NLO 购于德国蔡司公司)；Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System 为美国应用生物系统公司产品；Image Structure Analyzer-2 (ISA-2) 由美国蒙大拿州立大学 Haluk Beyenal 教授提供。

## 1.2 菌株的活化与生物被膜的培养

副溶血性弧菌(ATCC17802)菌株从-80 °C 冰箱中取出并划线于 TCBS 培养基, 37 °C 恒温过夜培养。挑取 TCBS 上单菌落接种到 9 mL 含 3% NaCl 的 TSB 液体培养基中, 在 37 °C 下摇床(200 r/min) 培养 12 h, 用含 3% NaCl 的 TSB 液体培养基将菌

液稀释到  $OD_{600}$  为 0.4。生物被膜的培养方法是在 Kadam 等的方法上作出改进<sup>[16]</sup>。取 10 μL 调好  $OD_{600}$  的 VP 菌液加入到含 990 μL 新鲜 TSB (3% NaCl) 培养基的 24 孔板中, 以新鲜的、未接种菌液的 TSB 作为空白对照, 每个菌株 3 个平行。所有的样品于 37 °C 恒温静置培养 24 h 获得预形成生物被膜, 之后预形成的生物被膜转移到低温条件(4 °C, 10 °C)或者维持在 37 °C, 分别静置培养 12、24、36、48、60 h, 并使用塑料包装将板密封以使蒸发损失最小化。

## 1.3 结晶紫染色

将 1.2.1 中 24 孔板取出, 弃去上层菌液, 每孔用 0.1 mol/L 的 PBS 洗 3 次去除浮游菌, 室温下放置 10 min。1 mL 0.1% 的结晶紫室温下染色 30 min,

0.1 mol/L 的 PBS 清洗 3 次,以除去多余的结晶紫。60 °C 的培养箱中干燥 45 min, 用 2 mL 95% 的乙醇溶解 30 min。以未接种菌液的新鲜的 TSB 培养基作为空白对照, 用酶标仪检测其在 570 nm 处的吸光度( $OD_{570}$ ), 以吸光度的值评估被膜的形成能力<sup>[17]</sup>。

#### 1.4 EPS 分析

副溶血性弧菌生物被膜中的胞外多糖用修正的超声法提取<sup>[18]</sup>。24 孔板中加入 1 mL 0.01 mol/L KCl, 通过涡旋和刮擦收集生物被膜细胞。超声波仪破碎细胞 4 个循环(操作 5 s, 暂停 5 s), 将超声处理的悬浮液离心(4000×g, 20 min, 4 °C), 取上清液 0.22 μm 滤膜过滤, 将 100 μL 滤液混合, 在新管中加入 200 μL 99.9% 硫酸。在室温下孵育 30 min 后, 向混合物中加入 6% 苯酚。90 °C 温育 5 min 后, 在 490 nm 处测量混合物的吸光度。通过  $OD_{490}/OD_{595}$  值来量化碳水化合物的量。

通过 Lowry 方法量化蛋白质的量<sup>[19]</sup>。将 40 μL 滤液与 200 μL Lowry 试剂在新管中混合。室温下孵育 10 min 后, 向混合物中加入 20 μL 福林酚试剂。室温下孵育 30 min 后, 750 nm 处测量吸光度。通过  $OD_{750}/OD_{595}$  来定量蛋白质的量。

#### 1.5 共聚焦激光扫描显微镜观察

使用 2 mL 4% (V/V) 戊二醛溶液在 4 °C 下固定生物被膜 2 h, 用 0.1 mol/L PBS 冲洗 3 次, 用 SYBR Green I 在室温下黑暗中保持 30 min<sup>[19]</sup>。然后 0.1 mol/L PBS 洗涤孔以除去过量的污渍并空气干燥。使用 20×物镜的共聚焦激光扫描显微镜获得 CLSM 图像。使用 ISA-2<sup>[20]</sup> 分析三维生物被膜结构形态。描述生物被膜物理结构的定量参数主要有平均厚度(mean thickness, MT), 平均扩散距离(average diffusion distance, ADD), 区域孔率

(porosity, P), 生物被膜粗糙度(biofilm roughness, BR)和均一性(homogeneity, H)。

#### 1.6 RNA 提取、逆转录和 RT-PCR 分析

使用 RNA 试剂盒提取和纯化来自生物被膜的总 RNA。通过测量 260 nm 和 280 nm 处的吸光度测定 RNA 浓度。使用 Prime Script RT 试剂盒和 gDNA Eraser (TaKaRa 公司)对 200 ng 总 RNA 进行逆转录(RT)。16S 基因作为内参<sup>[21]</sup>, 扩增反应体系为 20 μL: ddH<sub>2</sub>O 6 μL, ROX II 0.4 μL, mix 10 μL, 上下引物各 0.8 μL, 稀释 10 倍后的 cDNA 2 μL。使用 7500 Fast Real-Time PCR System 扩增仪扩增, 扩增一式两份进行。用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行统计分析相应基因的相对转录量<sup>[22]</sup>。

#### 1.7 统计分析

使用 SPSS 统计软件分析双向方差分析(ANOVA)、组间的 *t* 检验, 以及 Pearson 相关系数在 0.01 和 0.05 显著水平。如果  $P < 0.05$ , 则认为具有显著差异。使用 Microsoft Excel 2007 和 Origin 8.0 分别进行计算和数字分析。使用 Excel 2007 进行线性回归分析。

## 2 结果和分析

#### 2.1 冷激条件下预形成生物被膜生物量变化

冷激条件下结晶紫染色得到的生物被膜生物量变化如图 1 所示。总的来说, 在 4 °C、10 °C 和 37 °C 条件下, 预形成生物被膜的起始生物量为 0.399, 无论是否受到冷刺激, 生物被膜生物量随着培养时间的增加而增加, 且 37 °C 的生物被膜量显著高于 4 °C 和 10 °C。

#### 2.2 冷激对预形成生物被膜 EPS 的影响

为了评估冷激对 EPS 的影响, 我们分析了 12 h 到 60 h, EPS 的主要成分蛋白和多糖的变化。

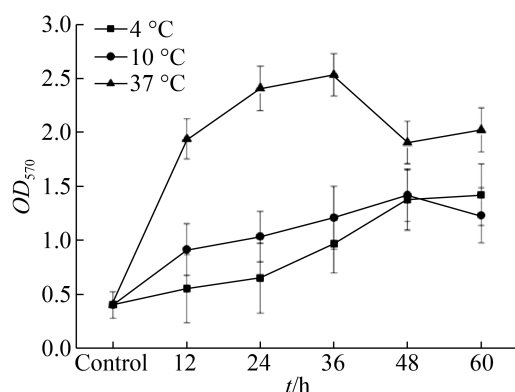


图 1. 4 °C、10 °C 和 37 °C 下，预形成生物被膜生物量的变化

Figure 1. The change of biofilm biomass of *V. parahaemolyticus* exposed to cold shock (4 °C and 10 °C) or kept at 37 °C. The data are presented as the mean of  $OD_{570} \pm$  standard deviation for three independent replicates.

图 2 中(A)为冷激后副溶血性弧菌生物被膜中胞外多糖总含量(柱)和平均值(线)变化趋势。(B)为冷激后副溶血性弧菌生物被膜蛋白的总含量(柱)和平均值(线)变化趋势。误差线表示 3 个测量值的标准差。\*表示显著性差异( $P < 0.05$ )。(C)为副溶血性弧菌生物被膜中胞外多糖和蛋白总含量的线性回归。

如图 2 所示，3 个温度条件下，蛋白和多糖随着培养时间的增加而不断增加，4 °C 和 10 °C 相比较，蛋白和多糖的变化并没有显著性差异。在 37 °C 培养 24 h 和 36 h 产生的 EPS 的含量显著高于( $P < 0.05$ )低温条件下的 EPS 量。然而，当培养时间为 48 h，低温条件下的胞外多糖含量均高于 37 °C。这说明，低温条件只能减缓胞外多糖的合成而不能完全抑制，这个实验结果与结晶紫染色的结果相同。图 2-C 展示了蛋白和多糖的相关性。以下为 3 个温度下的线性回归方程(方程 1、2、3)。

$$4\text{ °C}: y=0.7794x+0.0756 \quad R^2=0.9527 \quad (1)$$

$$10\text{ °C}: y=0.808x+0.0724 \quad R^2=0.9858 \quad (2)$$

$$37\text{ °C}: y=0.9066x-0.0031 \quad R^2=0.9288 \quad (3)$$

$R^2$ 值代表的是蛋白和多糖的相关性，与此同时，在 4 °C、10 °C 和 37 °C Pearson 相关系数分别为 0.976、0.993 和 0.964。三种温度条件下，蛋白和多糖均在 0.01 水平上显著相关(双侧)。这说明 EPS 的主要成分胞外蛋白和胞外多糖具有较高的一致性。

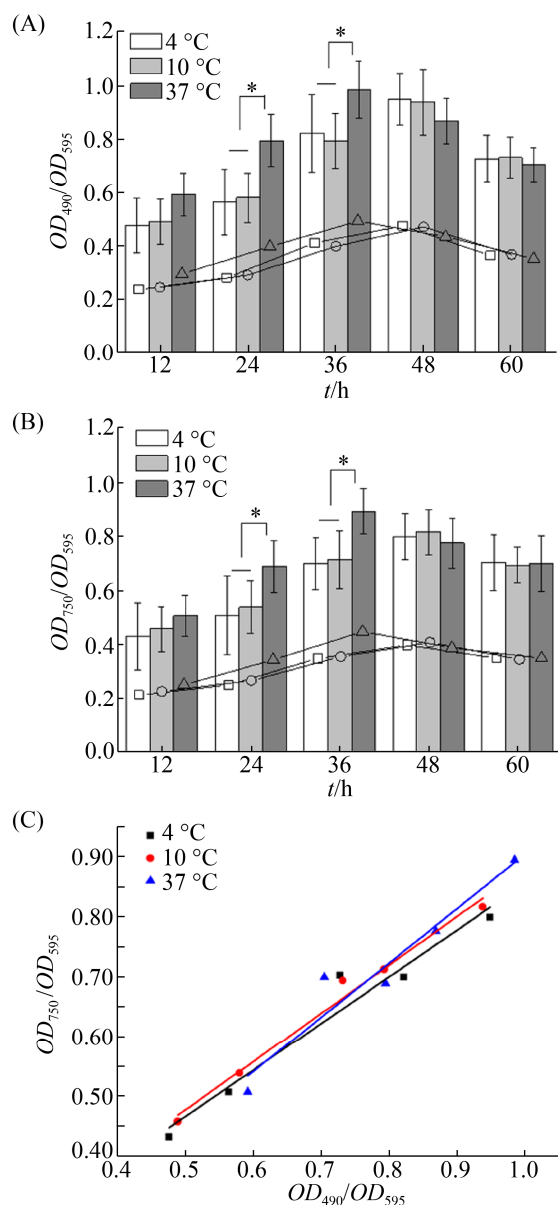


图 2. 4 °C、10 °C 或 37 °C 条件下 EPS 主要成分变化  
Figure 2. The contents change of EPS constituent exposed to cold shock (4 °C and 10 °C) or kept at 37 °C.

## 2.3 生物被膜形成相关基因的转录

为了更好地探究副溶血性弧菌预形成生物被膜在冷激条件下的变化, 我们分析了被膜形成相关基因的转录, 包括鞭毛基因(*pilA*)、QS 基因(*aphA*, *opaR*)、毒力基因(*trh*)和 T3SS 基因(*vcrD1*, *vopS*, *vopD1*, *vscC2 $\beta$* , *vcrD2 $\beta$* , *vopP2 $\beta$* )。表 2 为 4 °C 和 10 °C 或 37 °C 条件下, 处理 12 h、24 h、36 h、

48 h 和 60 h, 副溶血性弧菌生物被膜相关基因转录的变化情况, 以及同一温度条件下不同培养时间基因转录的显著性差异。由图 3 基因转录谱所示, 诱导转录用黄色表示, 抑制转录用蓝色表示, 很少变化的转录用黑色表示, 颜色比例显示在右下角。不同处理条件下, 鞭毛和毒力相关的基因产生了不同的转录。随着培养时间的增加, *aphA*、

表 2. 4 °C 和 10 °C 或 37 °C 下处理 12、24、36、48、60 h, 副溶血性弧菌生物被膜相关基因的转录

Table 2. Expression of a selected set of genes in *V. parahaemolyticus* biofilm exposed to 4 °C and 10 °C or kept at 37 °C for 12, 24, 36, 48, 60 h

Genes	<i>T</i> /°C	<i>t</i> /h				
		12	24	36	48	60
<i>pilA</i>	4	1.407±0.072 <sup>a</sup>	1.703±0.081 <sup>a</sup>	2.212±0.361 <sup>b</sup>	2.356±0.092 <sup>b</sup>	2.335±0.072 <sup>b</sup>
	10	1.609±0.045 <sup>a</sup>	1.806±0.080 <sup>b</sup>	2.294±0.082 <sup>c</sup>	3.184±0.072 <sup>d</sup>	3.096±0.083 <sup>d</sup>
	37	2.212±0.023 <sup>b</sup>	2.163±0.032 <sup>b</sup>	1.951±0.060 <sup>a</sup>	2.224±0.050 <sup>b</sup>	3.298±0.095 <sup>c</sup>
<i>aphA</i>	4	1.498±0.144 <sup>c</sup>	1.329±0.069 <sup>b,c</sup>	1.037±0.052 <sup>a</sup>	0.999±0.011 <sup>a</sup>	1.204±0.117 <sup>a,b</sup>
	10	1.817±0.103 <sup>c</sup>	1.313±0.071 <sup>b</sup>	0.998±0.063 <sup>a</sup>	0.918±0.128 <sup>a</sup>	1.405±0.026 <sup>b</sup>
	37	1.729±0.075 <sup>c</sup>	1.198±0.125 <sup>b</sup>	0.983±0.095 <sup>a</sup>	1.958±0.049 <sup>d</sup>	2.096±0.040 <sup>d</sup>
<i>opaR</i>	4	0.904±0.130 <sup>b</sup>	0.957±0.055 <sup>b</sup>	0.606±0.084 <sup>a</sup>	0.915±0.074 <sup>b</sup>	0.980±0.035 <sup>b</sup>
	10	0.702±0.905 <sup>a</sup>	0.908±0.134 <sup>b</sup>	1.203±0.079 <sup>c</sup>	1.660±0.049 <sup>d</sup>	1.302±0.056 <sup>c</sup>
	37	1.055±0.033 <sup>a</sup>	1.820±0.129 <sup>b</sup>	2.857±0.093 <sup>c</sup>	2.759±0.058 <sup>c</sup>	2.655±0.123 <sup>c</sup>
<i>trh</i>	4	2.412±0.137 <sup>b</sup>	1.324±0.359 <sup>a</sup>	1.025±0.154 <sup>a</sup>	1.050±0.128 <sup>a</sup>	1.126±0.095 <sup>a</sup>
	10	3.553±0.667 <sup>c</sup>	1.907±0.068 <sup>b</sup>	0.923±0.050 <sup>a</sup>	0.897±0.099 <sup>a</sup>	1.092±0.158 <sup>a</sup>
	37	1.410±0.301 <sup>b</sup>	1.913±0.217 <sup>b</sup>	1.591±0.300 <sup>b</sup>	1.871±0.100 <sup>b</sup>	0.048±0.061 <sup>a</sup>
<i>vcrD1</i>	4	0.813±0.035 <sup>a,b</sup>	0.614±0.067 <sup>a</sup>	0.865±0.102 <sup>b</sup>	0.886±0.150 <sup>b</sup>	1.135±0.130 <sup>c</sup>
	10	0.215±0.032 <sup>a</sup>	0.992±0.087 <sup>b</sup>	1.097±0.156 <sup>b</sup>	1.368±0.121 <sup>c</sup>	1.336±0.070 <sup>c</sup>
	37	0.803±0.096 <sup>a,b</sup>	0.838±0.118 <sup>a,b</sup>	0.691±0.076 <sup>a</sup>	0.935±0.092 <sup>b</sup>	1.463±0.092 <sup>c</sup>
<i>vops</i>	4	0.113±0.024 <sup>a</sup>	0.276±0.052 <sup>b</sup>	0.261±0.032 <sup>b</sup>	0.338±0.121 <sup>b</sup>	0.333±0.039 <sup>b</sup>
	10	0.370±0.146 <sup>b</sup>	0.124±0.025 <sup>a</sup>	0.405±0.033 <sup>b</sup>	0.391±0.022 <sup>b</sup>	0.260±0.032 <sup>a,b</sup>
	37	0.377±0.093 <sup>c</sup>	0.055±0.007 <sup>a</sup>	0.204±0.026 <sup>b</sup>	0.295±0.560 <sup>b,c</sup>	0.075±0.021 <sup>a</sup>
<i>vopD1</i>	4	1.585±0.434 <sup>b</sup>	1.006±0.182 <sup>a,b</sup>	1.600±0.290 <sup>b</sup>	1.259±0.245 <sup>a,b</sup>	0.800±0.010 <sup>a</sup>
	10	1.800±0.189 <sup>a</sup>	1.276±0.053 <sup>a</sup>	3.187±0.766 <sup>b</sup>	3.004±0.221 <sup>b</sup>	1.969±0.176 <sup>a</sup>
	37	0.653±0.239 <sup>a</sup>	2.268±0.465 <sup>b</sup>	1.324±0.415 <sup>a</sup>	0.821±0.206 <sup>a</sup>	3.931±0.545 <sup>c</sup>
<i>vscC2<math>\beta</math></i>	4	1.019±0.191 <sup>b</sup>	0.638±0.070 <sup>a</sup>	1.608±0.052 <sup>c</sup>	0.883±0.078 <sup>b</sup>	0.438±0.050 <sup>a</sup>
	10	1.242±0.191 <sup>a</sup>	0.981±0.168 <sup>a</sup>	1.353±0.225 <sup>a</sup>	2.210±0.180 <sup>b</sup>	1.275±0.176 <sup>a</sup>
	37	0.507±0.069 <sup>a</sup>	2.783±0.464 <sup>b</sup>	1.002±0.092 <sup>a</sup>	0.607±0.047 <sup>a</sup>	3.602±0.585 <sup>c</sup>
<i>vopD2<math>\beta</math></i>	4	1.001±0.160 <sup>a</sup>	1.051±0.300 <sup>a</sup>	1.255±0.127 <sup>a</sup>	1.344±0.211 <sup>a</sup>	1.044±0.072 <sup>a</sup>
	10	0.101±0.031 <sup>a</sup>	1.458±0.410 <sup>b,c</sup>	1.230±0.273 <sup>b</sup>	1.381±0.104 <sup>b,c</sup>	1.905±0.036 <sup>d</sup>
	37	1.284±0.198 <sup>c</sup>	1.023±0.135 <sup>c</sup>	0.642±0.150 <sup>b</sup>	1.225±0.202 <sup>c</sup>	0.095±0.027 <sup>a</sup>
<i>vopP2<math>\beta</math></i>	4	1.410±0.320 <sup>b</sup>	1.027±0.069 <sup>a,b</sup>	2.369±0.471 <sup>c</sup>	0.994±0.158 <sup>a,b</sup>	0.718±0.037 <sup>a</sup>
	10	3.445±0.404 <sup>b,c</sup>	1.257±0.262 <sup>a</sup>	4.184±0.485 <sup>c</sup>	2.716±0.362 <sup>b</sup>	1.393±0.138 <sup>a</sup>
	37	2.057±0.129 <sup>b</sup>	8.121±1.148 <sup>c</sup>	1.548±0.365 <sup>a,b</sup>	0.727±0.127 <sup>a</sup>	2.240±0.307 <sup>b</sup>

In the same row of data, there was no significant difference in the representation of the same letters, but there was significant difference in the representation of the same letters ( $P<0.05$ ). Flagella gene (*pilA*), QS gene (*aphA*, *opaR*), TRH gene (*trh*), T3SS (*vcrD1*, *vopS*, *vopD1*, *vcrD2 $\beta$* , *vscC2 $\beta$* , *vopP2 $\beta$* ).

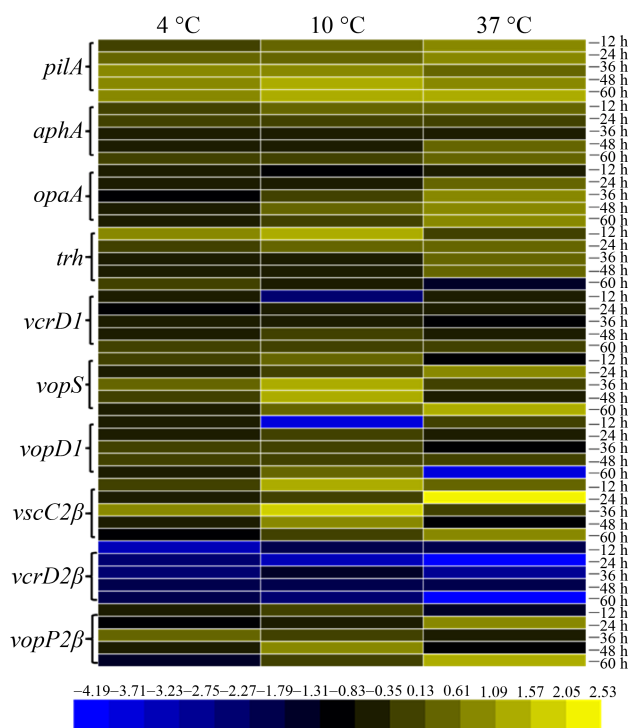


图 3. 4 °C 和 10 °C 或 37 °C 下处理 12、24、36、48、60 h, 副溶血性弧菌生物被膜相关基因的转录谱

Figure 3. Expression profiles of a selected set of genes in *V. parahaemolyticus* biofilm exposed to 4 °C and 10 °C or kept at 37 °C for 12, 24, 36, 48, 60 h.

*vscC2β* 和 *vopP2β* 基因逐渐上调, 而 *opaR* 和 *vopS* 基因的转录则无明显变化。在冷激之后, T3SS 基因(*vcrD1*, *vcrD2β* 和 *vopD1*)下调。与 4 °C、10 °C 相比, 37 °C 培养条件下鞭毛基因(*pilA*)、QS 基因(*aphA*, *opaR*)和毒力基因(*trh*)的转录量更高。此外, T3SS 相关基因尤其是 *vcrD1*、*vopD1* 和 *vcrD2β* 在 37 °C 下调更明显。这个结果说明, 尽管副溶血性弧菌生物被膜在 37 °C 恒温培养下生长更好, 但是, 预形成生物被膜细菌能逐渐适应冷激。基因转录的结果也与被膜生物量变化以及 EPS 成分变化的结果一致。

## 2.4 冷激条件下预形成生物被膜结构的变化

副溶血性弧菌预形成生物被膜的激光共聚焦图片如图 4-A 所示, 标尺代表 20 μm, 展示了副

溶血性弧菌具有形成复杂三维结构生物被膜的能力。与预形成被膜相比(图 4-A), 在 4 °C、10 °C 和 37 °C 三个条件下, 随着培养时间的增加, 被膜厚度均逐渐变大。图 4-B 展示了副溶血性弧菌在冷休克(4 °C 和 10 °C)或 37 °C 条件下形成生物膜的 CLSM 图像, 随着培养时间的增加, 生物被膜逐渐从单层结构变化成为复杂的立体结构。特别地, 当在 4 °C 和 10 °C 培养 36 h 或者 37 °C 培养 24 h 时, 生物被膜已完全覆盖接触表面。

图 5 汇总了被膜结构的参数信息。生物被膜平均厚度 MT 是微生物生物被膜研究中最常用的变量之一。预形成生物被膜的 MT 是 1.77, 10 °C 的条件下, MT 发生轻微的变化, 而 4 °C 和 37 °C 条件下, 变化则非常明显。平均扩散距离(ADD)被认为是测量微菌落内营养物质和其他基质成分从空隙传递到细菌的距离<sup>[27]</sup>。在本研究中, 预形成生物被膜的 ADD 值是 1.04, 同时, 低温(4 °C 和 10 °C)条件下的 ADD 比 37 °C 条件下的更高。被膜粗糙度(BR)是衡量生物被膜厚度变异性的指标<sup>[28]</sup>, 预形成生物被膜的 BR 值为 0.64。如图 5-D 所示, 随着培养时间的增加, BR 值在 4 °C 冷处理后逐渐增加, 而在 37 °C 则无显著性的变化。面积参数决定了生物被膜的形态结构, 本研究选择孔隙率(P)作为度量面积的参数, P 值随着细胞簇的增加而减少。预形成生物被膜的起始 P 值为 0.64, 同时如图 5-C 中所示, 在 4 °C 冷激以后, 随着培养时间的增加, P 值显著上升。结构熵(H)是度量图像灰度中随机性的参数, 熵值越大, 图像越不均匀。当转移到低温条件时, 预形成的生物被膜需要适应变化的环境, 以形成成熟的生物被膜。CLSM 图像与结晶紫染色结果一致。这些结果表明, 冷激只能延长生物被膜的成熟期, 而不能完全抑制生物被膜的生长。



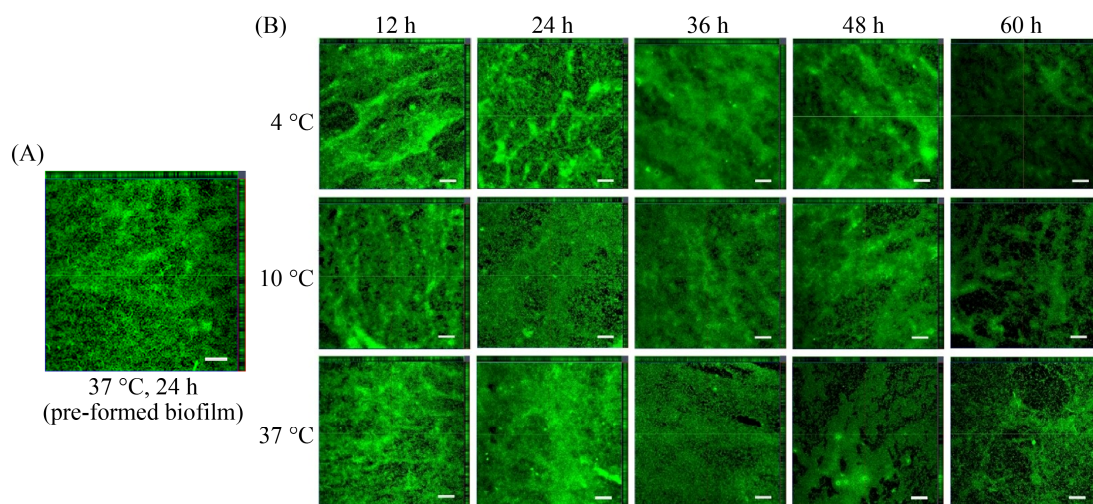
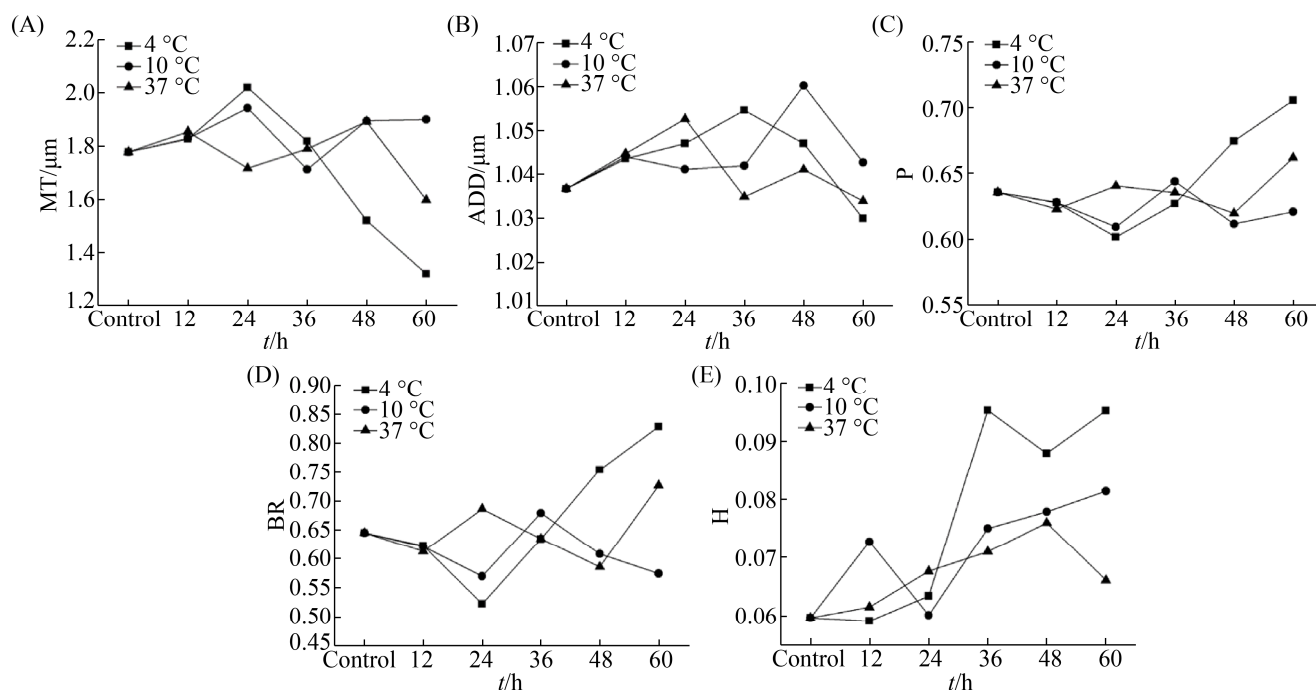
图 4. 副溶血性弧菌生物被膜激光扫描共聚焦显微镜图片<sup>[14]</sup>Figure 4. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images of *V. parahaemolyticus*<sup>[14]</sup>.

图 5. 4 °C、10 °C 和 37 °C 条件下, 副溶血性弧菌生物被膜结构参数的变化(3A-E)

Figure 5. Quantification of structural parameters changes (3A-E) in biofilm formed by *V. parahaemolyticus* after low temperature shift.

## 2.5 生物被膜结构参数和生物被膜相关基因转录的相关性分析

生物被膜结构参数之间的相关性如表 3 所示。对副溶血性弧菌 4、10 和 37 °C 条件下 6 个生物被

膜结构参数的分析表明, 生物被膜粗糙度(BR)与孔隙率(P)呈正相关。生物被膜的平均厚度(MT)与生物被膜粗糙度(BR)呈负相关, 生物被膜的平均厚度(MT)与孔隙度(P)呈负相关。与 10 °C 相比, 这些趋



势在 4 °C 更明显。

表 4 显示了 4 °C、10 °C 和 37 °C 下，具有显著相关性的生物被膜形成相关基因和被膜结构。*pilA* 与 H 之间，*vopP2β* 和 MT 以及 BR 在 0.05 水

平上(双侧)，*vcrD1* 和 MT、BR、P 之间，*vscC2β* 和 ADD 均存在明显的相关性。总的来说，冷激以后，副溶血性弧菌的鞭毛和 T3SS 基因与被膜结构之间有显著的相关性。

表 3. 生物被膜结构参数的相关性分析

Table 3. The correlation among biofilm structural parameters

<i>T</i> /°C	Biofilm structural parameters	MT		BR		P		ADD		H	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
4	MT	0	1	0.000	−0.996**	0.000	−0.999**	0.196	0.692	0.204	−0.683
	BR			0	1	0.001	0.992**	0.243	−0.642	0.182	0.707
	P					0	1	0.177	−0.713	0.222	0.664
	ADD							0	1	0.863	−0.108
	H									0	1
10	MT	0	1	0.007	−0.968**	0.008	−0.966**	0.729	0.215	0.640	−0.287
	BR			0	1	0.055	0.870	0.987	−0.01	0.697	0.240
	P					0	1	0.497	−0.406	0.600	0.320
	ADD							0	1	0.540	0.370
	H									0	1
37	MT	0	1	0.001	−0.992**	0.601	−0.319	0.719	0.222	0.590	0.328
	BR			0	1	0.723	0.220	0.875	−0.098	0.525	−0.382
	P					0	1	0.197	−0.691	0.736	0.209
	ADD							0	1	0.745	−0.201
	H									0	1

A: Sig. (2-tailed); B: Correlation coefficient; \*: correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed); \*\*: correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). MT: Mean thickness; ADD: Average diffusion distance; P: Porosity; BR: Biofilm roughness; H: Homogeneity.

表 4. 生物被膜结构参数和被膜形成相关基因的相关关系

Table 4. The correlation between biofilm structural parameters and biofilm formation related genes

Genes	<i>T</i> /°C	MT		BR		P		ADD		H	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>pilA</i>	4	0.178	−0.711	0.168	0.722	0.186	0.702	0.835	−0.13	0.013	0.951*
	10	0.773	0.179	0.818	−0.143	0.740	−0.205	0.293	0.592	0.019	0.936*
	37	0.139	−0.756	0.182	0.707	0.104	0.800	0.47	−0.43	0.664	−0.267
<i>vcrD1</i>	4	0.021	−0.932*	0.017	0.941*	0.026	0.921*	0.224	−0.661	0.165	0.725
	10	0.728	0.215	0.782	−0.172	0.682	−0.253	0.559	0.354	0.578	0.338
	37	0.172	−0.718	0.221	0.665	0.072	0.845	0.482	−0.419	0.833	−0.131
<i>vcrD2β</i>	4	0.450	0.448	0.536	−0.373	0.411	−0.482	0.172	0.718	0.776	−0.177
	10	0.240	−0.645	0.148	0.746	0.395	0.497	0.376	0.514	0.288	0.597
	37	0.004	−0.978**	0.011	0.957*	0.415	0.479	0.663	−0.268	0.741	−0.205
<i>vopP2β</i>	4	0.459	0.436	0.513	−0.393	0.394	−0.497	0.138	0.758	0.797	0.160
	10	0.033	−0.907*	0.010	0.958*	0.106	0.797	0.872	−0.101	0.676	0.257
	37	0.525	−0.382	0.401	0.491	0.295	−0.590	0.125	0.774	0.674	−0.259
<i>vscC2β</i>	4	0.516	0.390	0.606	−0.315	0.470	−0.430	0.098	0.808	0.779	0.175
	10	0.994	0.004	0.773	0.179	0.761	−0.189	0.008	0.966**	0.346	0.541
	37	0.009	−0.962**	0.006	0.971**	0.633	0.293	0.966	−0.027	0.708	−0.231

A: Sig. (2-tailed); B: Correlation coefficient; \*: correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed); \*\*: correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). MT: Mean thickness; ADD: Average diffusion distance; P: Porosity; BR: Biofilm roughness; H: Homogeneity; *pilA*: Flagella gene; *vcrD1*, *vcrD2β*, *vscC2β*, *vopP2β*: T3SS.

### 3 讨论

食品加工环境温度以及冷链温度常常会发生波动, 本研究中, 我们进一步了解在冷激条件下预形成的副溶血性弧菌生物被膜的命运变化, 发现生物被膜中的副溶血性弧菌细胞逐渐适应冷激并保护自身对抗冷环境。在恒温培养条件下, 低温条件下副溶血性弧菌生物被膜形成显著低于 37 °C。温度会影响细菌菌落形态、运动能力、胞外多糖和蛋白的产生, 从而影响生物被膜的形成。4 °C 和 15 °C 的低温条件下, 副溶血性弧菌菌落小而透明, 基本呈单细胞分布, 细菌之间也没有黏连, 胞外多糖和蛋白分泌量都非常低; 37 °C 菌落不透明, 且菌落直径较大, 细菌相互聚集并粘附在接触面上, 胞外蛋白和多糖分泌量显著的升高。副溶血性弧菌形成的褶皱、细菌之间的黏连以及胞外多聚物的生成能促进 VP 生物被膜的形成<sup>[14]</sup>。

在冷激条件下, 图 1 显示当转移到低温(4 °C 和 10 °C)时生物被膜生物量增加。编码鞭毛、毒力和 QS (*aphA*) 的基因在冷激后上调, 从而提高了生物被膜细胞存活的机会。如表 3 所示, 副溶血性弧菌鞭毛和 T3SS 基因(*pilA*, *vcrD1*, *vopP2β* 和 *vscC2β*)与冷激的生物被膜结构参数显著相关。弧菌属中的鞭毛通常通过增强菌株运动而促进表面附着<sup>[29]</sup>。Enos-Berlage 等<sup>[30]</sup>监测了副溶血性弧菌的生物被膜形成, 并观察到 *flgE* 和 *flgD* 突变体在附着和生物被膜形成方面存在缺陷。Asadishad 等<sup>[31]</sup>还发现暴露于低温的枯草芽孢杆菌, 其细菌游动能力下降, 并转录鞭毛蛋白编码的基因。我们推测副溶血性弧菌存在类似的机制, 当暴露在低温条件下, 通过鞭毛、毒力和 QS (*aphA*) 的基因的转录, 促进生物被膜形成, 保护细菌度过冷激。

细菌三型分泌系统(T3SS)可将效应蛋白直接从细菌细胞质输送到宿主细胞<sup>[32]</sup>, 一些研究得出结论, T3SS 基因的转录在生物被膜细菌中被抑制<sup>[33]</sup>。Ferreira 等<sup>[34]</sup>证明 T3SS1 基因的转录和生物被膜的产生是反向调节的。本研究中, 我们发现编码 T3SS 的基因(*vcrD1*, *vopD1* 和 *vcrD2β*)在冷激后也显著下调。研究结果与 Kuchma 等<sup>[33]</sup>和 Ferreira 等<sup>[34]</sup>的研究结果一致, 表明 T3SS 基因的转录可以反向调节副溶血性弧菌的生物被膜形成。此外, 我们发现 T3SS 部分基因(*vopS*, *vscC2β* 和 *vopP2β*)上调。这表明生物被膜形成和 T3SS 基因转录之间的关系因 T3SS 基因不同而异。T3SS 突变体会使生物被膜形成时的表面粘附过程受损, T3SS 突变体产生的蛋白会参与并影响代谢过程、能量产生、EPS 产生、细菌运动以及外膜蛋白的产生<sup>[35]</sup>。

冷链是易腐食品保存和运输的主要方法, 以确保消费者可以享受安全和优质的食品。然而, 之前的研究表明, 冷链的效果有时不太理想<sup>[36]</sup>。本研究中指出, 冷激诱导生物被膜形成相关基因的转录, 同时, 生物被膜生物量增长导致生物被膜细胞具有适应低温变化的能力。有趣的是生物被膜细胞如何感知冷激信号并调节基因转录; 培养 60 h 后生物被膜是否因环境资源的限制而开始崩解; 此外, 不同程度的预形成生物膜在 4 °C 和 10 °C 下的发展情况等问题, 这些均有待进一步的研究。

本研究发现冷激(4 °C 和 10 °C)条件下, 副溶血性弧菌预形成生物被膜生物量和胞外多聚物均上升, 同时被膜形成相关的基因转录活跃, 低温冷激不能完全抑制食源性致病菌的生长。依靠低温和冷链控制食源性致病菌是一个潜在的食品安全风险, 相关的风险评估措施应将此考虑其中, 本研究也为今后食品工业冷藏水产品的安全提供了理论基础。

## 参考文献

- [1] Janissen R, Murillo DM, Niza B, Sahoo PK, Nobrega MM, Cesar CL, Temperini MLA, Carvalho HF, de Souza AA, Cotta MA. Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9856.
- [2] Yildiz FH, Visick KL. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(3): 109–118.
- [3] Sultana M, Nusrin S, Hasan NA, Sadique A, Ahmed KU, Islam A, Hossain A, Longini I, Nizam A, Huq A, Siddique AK, Sack DA, Sack RB, Colwell RR, Alam M. Biofilms comprise a component of the annual cycle of *Vibrio cholerae* in the bay of bengal estuary. *mBio*, 2018, 9(2): e00483-18.
- [4] Elexson N, Afsah-Hejri L, Rukayadi Y, Soopna P, Lee HY, Tuan Zainazor TCT, Ainy MN, Nakaguchi Y, Mitsuaki N, Son R. Effect of detergents as antibacterial agents on biofilm of antibiotics-resistant *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *Food Control*, 2014, 35(1): 378–385.
- [5] Wong HC, Ting SH, Shieh WR. Incidence of toxigenic *Vibrios* in foods available in Taiwan. *The Journal of Applied Bacteriology*, 1992, 73(3): 197–202.
- [6] Yeung PSM, Boor KJ. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2004, 1(2): 74–88.
- [7] Broberg CA, Calder TJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and Infection*, 2011, 13(12/13): 992–1001.
- [8] Ng WL, Bassler BL. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*, 2009, 43: 197–222.
- [9] Calder T, de Souza Santos M, Attah V, Klimko J, Fernandez J, Salomon D, Krachler AM, Orth K. Structural and regulatory mutations in *Vibrio parahaemolyticus* type III secretion systems display variable effects on virulence. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 361(2): 107–114.
- [10] Turner JW, Malayil L, Guadagnoli D, Cole D, Lipp EK. Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* with respect to seasonal fluctuations in temperature and plankton abundance. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(4): 1019–1028.
- [11] Cook DW, Rupple AD. Indicator bacteria and *Vibrionaceae* multiplication in post-harvest shellstock oysters. *Journal of Food Protection*, 1989, 52(5): 343–349.
- [12] Burnham VE, Janes ME, Jakus LA, Supan J, DePaola A, Bell J. Growth and survival differences of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains during cold storage. *Journal of Food Science*, 2009, 74(6): M314–M318.
- [13] Han N, Mizan MFR, Jahid IK, Ha SD. Biofilm formation by *Vibrio parahaemolyticus* on food and food contact surfaces increases with rise in temperature. *Food Control*, 2016, 70: 161–166.
- [14] 宋雪迎. 温度影响副溶血性弧菌生物被膜形成的初步机理研究. 上海海洋大学硕士学位论文.
- [15] Laguerre O, Hoang HM, Flick D. Experimental investigation and modelling in the food cold chain: thermal and quality evolution. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 29(2): 87–97.
- [16] Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(6): 2950–2958.
- [17] Han Q, Song XY, Zhang ZH, Fu JJ, Wang X, Malakar PK, Liu HQ, Pan YJ, Zhao Y. Removal of foodborne pathogen biofilms by acidic electrolyzed water. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 988.
- [18] Kim HS, Park HD. Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *PLoS One*, 2013, 8(9): e76106.
- [19] Song XY, Ma YJ, Fu JJ, Zhao AJ, Guo ZR, Malakar PK, Pan YJ, Zhao Y. Effect of temperature on pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* biofilm formation. *Food Control*, 2017, 73: 485–491.
- [20] Resat H, Renslow RS, Beyenal H. Reconstruction of biofilm images: combining local and global structural parameters. *Biofouling*, 2014, 30(9): 1141–1154.
- [21] Eleaume H, Jabbouri S. Comparison of two standardisation methods in real-time quantitative RT-PCR to follow *Staphylococcus aureus* genes expression during *in vitro* growth. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 59(3): 363–370.
- [22] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [23] Wang L, Ling Y, Jiang HW, Qiu YF, Qiu JF, Chen HP, Yang RF, Zhou DS. AphA is required for biofilm formation, motility, and virulence in pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 160(3): 245–251.
- [24] Zhang YQ, Zhang LY, Hou SN, Huang XX, Sun FJ, Gao H. The master quorum-sensing regulator OpaR is activated indirectly by H-NS in *Vibrio parahaemolyticus*. *Current Microbiology*, 2016, 73(1): 71–76.
- [25] Shime-Hattori A, Iida T, Arita M, Park KS, Kodama T, Honda T. Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different

- roles in biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 264(1): 89–97.
- [26] Nilsson WB, Turner JW. The thermostable direct hemolysin-related hemolysin (*trh*) gene of *Vibrio parahaemolyticus*: Sequence variation and implications for detection and function. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, 126: 1–7.
- [27] Yang XM, Beyenal H, Harkin G, Lewandowski Z. Quantifying biofilm structure using image analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 39(2): 109–119.
- [28] Heydorn A, Nielsen AT, Hentzer M, Sternberg C, Givskov M, Ersbøll BK, Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 2000, 146(10): 2395–2407.
- [29] O’Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 1998, 30(2): 295–304.
- [30] Enos-Berlage JL, Guvener ZT, Keenan CE, McCarter LL. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(4): 1160–1182.
- [31] Asadishad B, Olsson ALJ, Dusane DH, Ghoshal S, Tufenkji N. Transport, motility, biofilm forming potential and survival of *Bacillus subtilis* exposed to cold temperature and freeze-thaw. *Water Research*, 2014, 58: 239–247.
- [32] Kudryashev M, Stenta M, Schmelz S, Amstutz M, Wiesand U, Castaño-Díez D, Degiacomi MT, Münnich S, Bleck CKE, Kowal J, Diepold A, Heinz DW, Dal Peraro M, Cornelis GR, Stahlberg H. *In situ* structural analysis of the *Yersinia enterocolitica* injectisome. *Elife*, 2013, 2: e00792.
- [33] Kuchma SL, Connolly JP, O’Toole GA. A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(4): 1441–1454.
- [34] Ferreira RBR, Chodur DM, Antunes LCM, Trimble MJ, McCarter LL. Output targets and transcriptional regulation by a cyclic dimeric GMP-responsive circuit in the *Vibrio parahaemolyticus* Scr network. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(5): 914–924.
- [35] Zimaro T, Thomas L, Marondedze C, Sgro GG, Garofalo CG, Ficarra FA, Gehring C, Ottado J, Gottig N. The type III protein secretion system contributes to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* biofilm formation. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 96.
- [36] Mercier S, Villeneuve S, Mondor M, Uysal I. Time-temperature management along the food cold chain: a review of recent developments. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2017, 16(4): 647–667.

# Fate of pre-formed *Vibrio parahaemolyticus* biofilm under cold shock

Wenying Yu<sup>1</sup>, Qiao Han<sup>1</sup>, Xueying Song<sup>1</sup>, Haiquan Liu<sup>1,2,3</sup>, Pradeep K Malakar<sup>1</sup>, Yingjie Pan<sup>1,2,3</sup>, Yong Zhao<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

<sup>2</sup> Shanghai Engineering Research Center of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China

<sup>3</sup> Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China

**Abstract:** [Objective] The aim of the study was to analyze changes of pre-formed *Vibrio parahaemolyticus* biofilm under cold shock. The source of persistent infections can be biofilms that occur naturally on food surfaces and medical biomaterials. The change of pre-formed *Vibrio parahaemolyticus* biofilm under cold shock was studied. [Methods] The changes of biofilm biomass were checked by crystal violet staining, exopolysaccharides and proteins were quantified by modified sonication method and Lowry method, and genes related to the expression of biofilm were extracted and purified by RNA extraction kit. The Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images reveal biofilm morphological structure, the correlation analysis shows inner relationship among biofilm structure parameters and biofilm related genes. [Results] *V. parahaemolyticus* biofilm biomass increased significantly during this cold shock period. Polysaccharides and proteins increased gradually in the extracellular polymeric matrix (EPS). In addition, the expression of flagella and virulence-related genes were differentially regulated. The architecture of the biofilm, quantified using mean thickness, average diffusion distance, porosity, biofilm roughness and homogeneity also changed during the cold shock and these parameters were correlated ( $P < 0.01$ ). However, the correlation between biofilm architecture and biofilm-related gene expression was relatively weak ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] Cold shock at 4 °C and 10 °C is not sufficient to reduce *V. parahaemolyticus* biofilm formation.

**Keywords:** cold shock, pre-formed biofilm, *Vibrio parahaemolyticus*, biofilm-related genes transcription, biofilm architecture

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31671779, 31571917), by the National Key R&D Program of China (2018YFC1602200, 2018YFC1602205), by the Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (T20170404), by the Innovation Program of Shanghai Municipal Education Commission (2017-01-07-00-10-E00056) and by the “Dawn” Program of Shanghai Education Commission (15SG48)

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

Received: 3 March 2019; Revised: 3 June 2019; Published online: 17 October 2019