

生物膜降解酶对 304 不锈钢上副溶血弧菌生物膜形成的抑制作用

董汝月, 常晶, 史国萃, 于晓倩, 刘尊英

(中国海洋大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266003)

摘要:以副溶血弧菌生物膜基质为靶点, 采用 96 孔板结晶紫染色法筛选出纤维素酶、脂肪酶、蛋白酶 k 为单酶, 将单酶组合为复合酶, 在单因素实验的基础上, 采用响应面分析法优化组合酶浓度。通过结晶紫染色、菌落计数、扫描电镜等, 评价组合酶对 304 不锈钢上副溶血弧菌生物膜的抑制作用。响应面优化得到的组合酶中纤维素酶浓度为 1.00 mg/mL, 脂肪酶浓度为 1.10 mg/mL, 蛋白酶 k 浓度为 1.50 μ g/mL 时生物膜抑制率最大, 为 89.73%, 比优化之前的各单酶相比, 对副溶血弧菌生物膜的抑制率有显著性提高, 与预测基本相符, 说明模型拟合良好, 组合酶中各单酶浓度准确可行。优化得到的组合酶有效抑制了 304 不锈钢上副溶血弧菌生物膜的生长, 抑制率为 59.35%, 扫描电镜图也证实了复合酶的抑制效果。生物膜降解酶复合有效提升了生物膜的抑制率, 为致病微生物膜的降解及消除提供了新的思路。

关键词: 副溶血弧菌; 生物膜; 生物膜降解酶; 响应面分析

文章编号: 1673-9078(2020)04-150-156

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.020

Inhibitory Actions of Biofilm-degrading Enzymes against the Biofilm Formed by *Vibrio parahaemolyticus* on 304 Stainless Steel

DONG Ru-yue, CHANG Jing, SHI Guo-cui, YU Xiao-qian, LIU Zun-ying

(College of Food Science and Engineering Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* biofilm matrix was used as the target, and cellulase, lipase and protease K were screened and selected as single enzymes by the crystal violet staining assay using 96-well plates. These single enzymes were combined to form composite enzymes. On the basis of single factor experiments, response surface methodology was used to optimize the concentration of the combined enzymes. The inhibitory actions of the combined enzymes against *Vibrio parahaemolyticus* biofilm on 304 stainless steel were evaluated by the crystal violet staining assay, colony counting and scanning electron microscopy. The composite enzymes obtained by response surface optimization with 1.00 mg/mL of cellulase, 1.10 mg/mL of lipase and 1.50 μ g/mL of protease K exhibited the highest inhibition rate (89.73%). The rate of inhibition for the composite enzyme against the *Vibrio parahaemolyticus* biofilm significantly increased compared with the single enzyme, which was generally in accordance with the predicted value. These results indicated that the model fitted well and the concentration of each enzyme in the composite enzyme was accurate and feasible. The optimized composite enzymes inhibited effectively the growth of *Vibrio parahaemolyticus* biofilm on 304 stainless steel with the inhibition rate as 59.35%. Examinations by scanning electron microscopy also confirmed the inhibitory effect of the composite enzymes. The composite enzymes can effectively increase the rate of inhibition against biofilm, which provides new ideas for the degradation and elimination of pathogenic bacterial biofilms.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; biofilm; biofilm-degrading enzyme; response surface analysis

引文格式:

董汝月, 常晶, 史国萃, 等. 生物膜降解酶对 304 不锈钢上副溶血弧菌生物膜形成的抑制作用研究[J]. 现代食品科技, 2020, 36(4): 150-156

DONG Ru-yue, CHANG Jing, SHI Guo-cui, et al. Inhibitory actions of biofilm-degrading enzymes against the biofilm formed by *Vibrio parahaemolyticus* on 304 stainless steel [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 150-156

收稿日期: 2019-09-27

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2019GNC106064)

作者简介: 董汝月 (1994-), 女, 硕士, 研究方向: 水产品高值化利用

通讯作者: 刘尊英 (1974-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 水产品高值化利用

副溶血弧菌属于嗜盐性的革兰阴性菌, 可以从海产品如鱼、对虾、蟹、贝类和海藻中分离得到, 是引起食源性疾病的主要致病菌之一^[1,2]。副溶血弧菌污染食品后, 极易引起急性肠胃炎, 使人发生恶心、呕吐、腹泻等症状^[3,4], 严重者可以引起昏迷、脱水甚至死亡。

细菌生物膜是细菌黏附在非生物或生物表面, 并被自身分泌的胞外多聚物如蛋白质、糖类、脂类、胞外 DNA 等包裹形成的一种高度组织化、系统化的微生物膜状结构, 是细菌在恶劣环境中为适应生存环境而形成的一种与浮游状态相对应的存在形式^[5,6]。生物膜内有细胞外基质包裹的多层细菌生长, 可避免被宿主防御系统清除, 并阻碍大部分抗菌药物进入细菌内^[7-9]。与浮游细胞相比, 形成生物膜的细菌对抗菌药物的抵抗能力会提高, 形成生物膜的细菌具有高度耐药性和能逃避免疫系统攻击的特点, 使其感染易慢性化并难于控制^[10,11]。因此, 开发有效的控制和去除细菌生物膜的方法是必要的。

由于生物膜降解酶能分解细胞外基质, 促进生物膜分离, 因此被认为是一种新型的、环保的生物膜控制方法^[12,13]。由于细菌生物膜基质的多样性, 不同生物膜降解酶对细菌的作用不尽相同。研究表明, 纤维素酶对玻璃表面铜绿假单胞菌生物膜的形成有部分抑制作用^[14]。 α -淀粉酶可以有效的清除芽孢杆菌的生物膜, 并抑制生物膜的形成^[15]。

生物膜降解酶是去除细菌生物膜的有效途径, 目前关于不同生物膜降解酶的协同增效作用缺乏了解。因此, 本研究旨在探讨脂肪酶、纤维素和蛋白酶 K 的复合优化, 并对其在 304 食品级不锈钢上副溶血性弧菌生物膜的抑制作用进行初步研究。研究结果有助于控制副溶血性弧菌生物膜的形成, 进一步为生物膜降解酶的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

副溶血弧菌 VIB461 由中国海洋大学应用海洋微生物实验室提供。

1.1.2 培养基及酶

2216E 琼脂、TSB(3% NaCl)肉汤、TSA(3% NaCl)琼脂购自索莱宝生物科技有限公司; 纤维素酶 (3 U/mg)、脂肪酶 (20 U/mg)、蛋白酶 k (30 U/mg) 购自索莱宝生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器及试剂

PBS 缓冲液、结晶紫、醋酸钠缓冲液、96 孔板、

全自动高压灭菌锅, 致微仪器有限公司; 超净工作台, 苏州苏洁净化设备有限公司; 振荡培养箱, 国华电器有限公司; 酶标仪, 美国 Bio-Tek 公司; 扫描电镜, 德国 ZEISS 公司; 实验所用试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液的制备

从 -80 °C 冰箱中取出保存的副溶血弧菌 VIB461 菌株在 2216E 琼脂平板上活化, 挑取单菌落至含 3% NaCl TSB, 过夜活化后, 按 1% 的比例接种于新鲜的含 3% NaCl TSB 中, 30 °C、180 rpm/min 振荡培养过夜至菌液浓度为 10^8 CFU/mL。

1.2.2 复合生物酶生物膜降解酶对副溶血弧菌生物膜的抑制

将制备好的菌悬液按 1% 的接种量与酶以 1:3 的比例加入到 96 孔板中, 同时设酶的对照组。将 96 孔板放置于 30 °C、180 r/min 振荡培养 24 h。

1.2.3 副溶血弧菌生物膜的测定

采用结晶紫染色方法, 取出孔板, 弃去游离菌, 用 300 μ L 无菌生理盐水清洗 3 次, 然后 60 °C 干燥固定 15 min, 再每孔加入 0.1% 的结晶紫溶液 300 μ L, 染色 15 min, 用 300 μ L 无菌生理盐水清洗 3 次, 干燥后加入 95% 的无水乙醇 300 μ L, 放置 10 min, 在 595 nm 波长处测 OD 值, 抑制率计算参考下式:

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{实验组}}}{OD_{\text{对照组}}} \times 100$$

1.2.4 单因素实验

纤维素酶、脂肪酶、蛋白酶 k 浓度对副溶血弧菌生物膜形成的影响, 采用二倍稀释法将单酶进行稀释, 按 1.2.2 的方法加入到菌液中培养, 设定相应的对照组, 采用结晶紫染色法测定生物膜的抑制率。

1.2.5 响应面优化实验设计

在单因素优化试验的基础上以最优纤维素酶浓度 (A)、脂肪酶浓度 (B)、蛋白酶 k 浓度 (C)、自变量, 根据 Box-Behnken 设计原理^[16], 进行响应面分析试验。以生物膜抑制率为响应值, 优化三种酶的浓度并组成最佳酶组合。因素水平设计见表 1。

表 1 Box-Behnken 实验设计因素和水平表

Table 1 Factors and levels of box-behnken

因素	编码	水平 Level		
		-1	0	1
纤维素酶浓度/(mg/mL)	A	1.00	1.50	2.00
脂肪酶浓度/(mg/mL)	B	1.00	1.50	2.00
蛋白酶 k 浓度/(\mu g/mL)	C	1.50	2.00	2.50

1.2.6 304 不锈钢上生物膜的菌落计数

菌落计数:将 304 不锈钢片切割为长 2 cm 宽 1 cm 的长方形,灭菌后加入到菌液中,按 1.2.2 方法培养 24 h 后小心取出,将 PBS 清洗后的不锈钢片放入 5 mL 的生理盐水中,在 20%功率的超声波振荡器中振荡 10 min,计算不锈钢上生物膜活菌数。

1.2.7 304 不锈钢上生物膜的结晶紫染色

在含有 TSB 培养基和不锈钢片试管中,将制备好的 10^8 CFU/mL 的菌悬液按 1%的接种量与酶以 1:3 的比例加入,180 r/min 培养 24 h,取出不锈钢片。用 1.2.3 的方法测定生物膜形成。

1.2.8 扫描电镜观察 304 不锈钢上的生物膜

在含有 TSB 培养基和不锈钢片试管中,将制备好的 10^8 CFU/mL 的菌悬液按 1%的接种量与酶以 1:3 的比例加入,180 r/min 培养 24 h,取出不锈钢片,用 PBS 冲洗两遍,加入 2.5%戊二醛固定液在 4℃条件下固定 12 h,经过漂洗、乙醇逐级梯度脱水、干燥、装样后,在扫描电镜下观察。

1.2.9 数据分析

试验数据均用平均值±标准差表示,用 SPSS 软件对数据进行单因素方差分析,进行多重比较, $p < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 不同浓度纤维素酶对副溶血弧菌生物膜的抑制作用

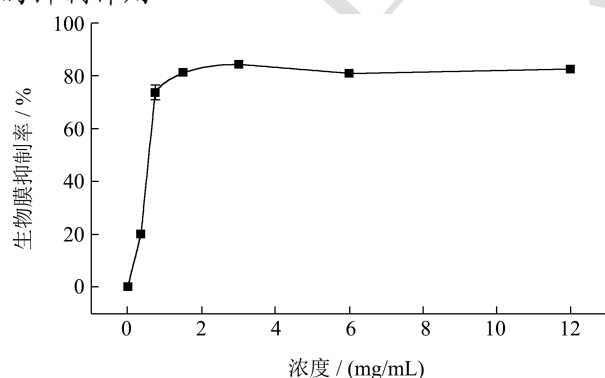


图1 不同浓度纤维素酶对副溶血弧菌生物膜的抑制作用

Fig.1 Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* biofilm by different concentration of cellulase

运用不同浓度的纤维素酶研究纤维素酶浓度对副溶血弧菌生物膜的抑制作用,如图1所示,随着纤维素酶浓度的增加,副溶血弧菌生物膜的抑制率逐渐上升,当纤维素酶浓度为 1.50 mg/mL 时,生物膜抑制率达到最高为 81.94%,之后趋于平缓,说明在纤维素酶

浓度较低时生物膜的抑制率对纤维素酶浓度依赖性增加,但纤维素酶浓度到达 1.50 mg/mL 之后,抑制率没有发生显著性变化。Nguyen 等研究发现,与低浓度相比,递增浓度的 DNase I 不会更多抑制单增李斯特菌生物膜的形成^[17],本研究中,与低于 1.50 mg/mL 相比,递增浓度的纤维素酶不会抑制更多的副溶血弧菌生物膜的形成,与之前的研究结果相符,因此选择纤维素酶浓度的最佳点为 1.50 mg/mL。

2.1.2 不同浓度脂肪酶对副溶血弧菌生物膜的抑制作用

采用纤维素酶同样的方法对脂肪酶浓度进行优化,结果如图2所示。随着脂肪酶浓度的增加,生物膜的抑制率呈先上升后下降的趋势, Lefebvre 等人研究发现, α -淀粉酶反而增加了荧光假单胞菌的代谢活性,并且表明所选择的酶在生物膜控制中的作用是适度的,因此,我们猜测,脂肪酶在培养生物膜后期会出现抑制率降低的情况,需进一步研究^[18]。在脂肪酶浓度为 1.50 mg/mL 时,副溶血弧菌生物膜抑制率达到最高值 60.21%,因此选择脂肪酶浓度为 1.50 mg/mL。

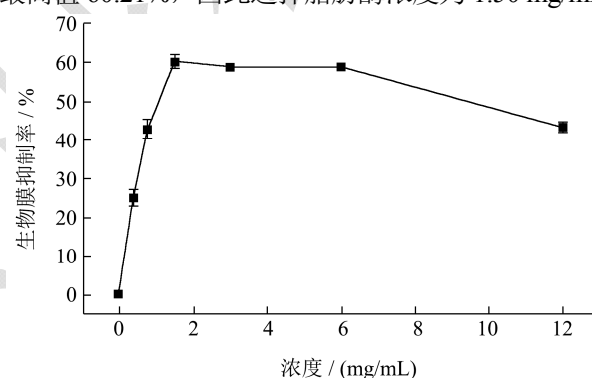


图2 不同浓度脂肪酶对副溶血弧菌生物膜的抑制作用

Fig.2 Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* biofilm by different concentration of lipase

2.1.3 不同浓度蛋白酶 k 对副溶血弧菌生物膜的抑制作用

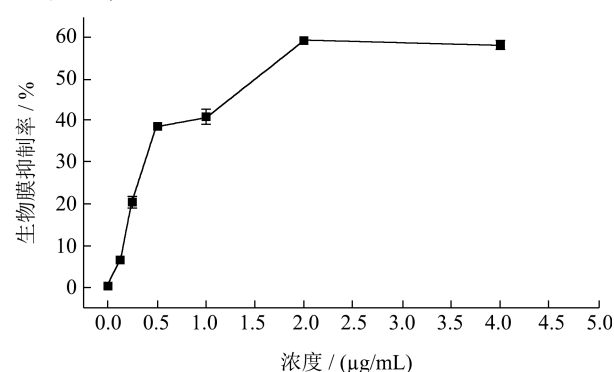


图3 不同浓度蛋白酶 k 对副溶血弧菌生物膜的抑制作用

Fig.3 Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* biofilm by different concentration of protease k

蛋白酶 k 对副溶血弧菌生物膜的抑制作用如图 3 所示,随着蛋白酶浓度的增加,副溶血弧菌生物膜的抑制率逐渐上升,当蛋白酶 k 浓度为 2.00 $\mu\text{g/mL}$ 时,生物膜抑制率达到最高为 58.96%,之后趋于平缓,说明在浓度较脂肪酶浓度较低时生物膜的抑制率对蛋白酶 k 浓度依赖性增加,但纤维素酶浓度到达 2.00 $\mu\text{g/mL}$ 之后,抑制率没有发生显著性变化。Nguyen 等人研究发现,蛋白酶 k 浓度到达一定数值后,其对

李斯特菌生物膜的清除率不再增加^[17]。与前人对蛋白酶 k 的研究相比,本研究中的蛋白酶 k 浓度也会在一定数值后其作用不再增加,但由于作用的细菌不同,蛋白酶 k 的最佳浓度也不同,因此,在本研究中选择蛋白酶 k 浓度的最佳点为 1.50 mg/mL。

2.2 响应面实验结果

2.2.1 响应面实验设计与结果及方差分析

表 2 实验数据与结果

Table 2 Experimental data and results

编号	纤维素酶(A)/(mg/mL)	脂肪酶(B)/(mg/mL)	蛋白酶 k(C)/($\mu\text{g/mL}$)	生物膜抑制率/%
1	1.50	1.50	2.00	89.27
2	1.50	2.00	1.50	87.25
3	1.00	1.00	2.00	89.36
4	1.00	1.50	1.50	89.13
5	1.50	1.00	2.50	87.94
6	1.50	1.50	2.00	89.32
7	2.00	1.00	2.00	87.86
8	2.00	1.50	2.50	88.00
9	1.50	1.00	1.50	89.32
10	2.00	2.00	2.00	87.16
11	1.00	2.00	2.00	87.70
12	1.00	1.50	2.50	89.21
13	1.50	1.50	2.00	88.89
14	1.50	1.50	2.00	89.09
15	1.50	1.50	2.00	88.98
16	1.50	2.00	2.50	87.86
17	2.00	1.50	1.50	88.10

表 3 方差分析表

Table 3 Analysis of variance

变异源	平方和	自由度	均方和	F 值	P 值
模型	9.63	9	1.07	34.65	<0.0001
A-纤维素酶	2.29	1	2.29	74.13	<0.0001
B-脂肪酶	2.54	1	2.54	82.31	<0.0001
C-蛋白酶 k	0.078	1	0.078	2.53	0.1560
AB	0.23	1	0.23	7.46	0.0293
AC	8.100E-003	1	8.100E-003	0.26	0.6244
BC	0.99	1	0.99	32.05	0.0008
A ²	0.35	1	0.35	11.17	0.0124
B ²	2.72	1	2.72	88.06	<0.0001
C ²	0.19	1	0.19	6.23	0.0413
残差	0.22	7	0.031		
失拟项	0.018	3	0.027	0.80	0.5568
纯误差	0.14	4	0.034		
总计	9.85	16			

采用 Design-Expert 软件, 分别对纤维素酶、脂肪酶、蛋白酶 k 三个对副溶血弧菌生物膜抑制效果进行 Box-Behnken 试验设计, 获得 17 个试验点, 实验数据与结果如表 2 所示。确定生物膜抑制率对以上因素的二次多项回归模型为:

$$Y=89.11-0.53A-0.56B-0.099C+0.24AB-0.045AC+0.50BC-0.29A^2-0.80B^2-0.21C^2$$

由方差分析表 3 可知, 实验选用的模型 $p<0.0001$, 表明该模型极显著; 失拟项 $p=0.5568>0.05$, 表明失拟项不显著, 与实际实验拟合度好; 模型的校正系数 $R_{Adj}=0.9498$, 表明该模型可以评价 94.98% 生物膜抑制率的变化。 $R=0.9780$, 表明实验误差小, 该模型适合分析纤维素酶、脂肪酶、蛋白酶 k 三种酶对 VP 生物膜抑制的影响。通过 F 检验结果可知, 各种酶对生物膜影响的主次顺序为 $B>A>C$, 即脂肪酶对响应值的影响最大, 其次是纤维素酶, 最后是蛋白酶 k。模型中一次项 A、B 对响应值的影响均为极显著 ($p<0.01$), 模型中交互项 AB、BC 对相应值的影响为显著 ($p<0.05$), AC 对相应值的影响为不显著 ($p>0.05$)。

2.2.2 响应面分析

通过纤维素酶与脂肪酶 (AB)、纤维素酶与蛋白酶 k (AC)、脂肪酶与蛋白酶 k (BC) 的响应面图可以看出 (图 4 所示), 脂肪酶与蛋白酶 k (BC) 响应面弯曲程度最大, 表明两者交互作用最明显, 脂肪酶和蛋白酶 k 对生物膜的抑制作用可以相互促进; 纤维素酶与脂肪酶 (AB) 响应面弯曲程度次之, 表明两者交互作用次之; 最后是纤维素酶与蛋白酶 k (AC), 两者响应面较平坦, 交互作用不明显。这与方差分析结果相吻合。

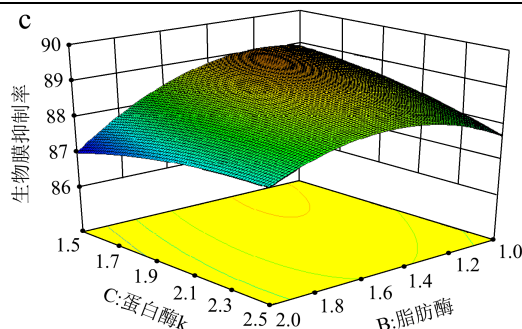
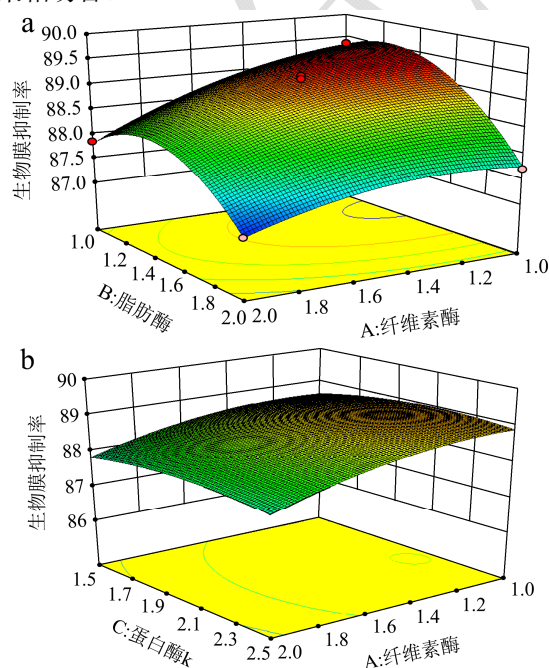


图 4 各因素对副溶血弧菌生物膜抑制率影响的响应面图

Fig.4 Response surface map of the effects of various factors on the inhibition rate of *Vibrio parahaemolyticus* biofilm

2.2.3 最佳复合酶验证

利用 Design-Expert 软件进行响应参数的优化, 通过响应曲面分析, 确定获得生物膜抑制率最大值的条件为: 纤维素酶浓度为 1.00 mg/mL, 脂肪酶浓度为 1.10 mg/mL, 蛋白酶 k 浓度为 1.50 mg/mL, 此时生物膜抑制率最大为 89.73%, 根据优化条件得到的抑制率为 89.65%, 与预测基本相符, 无显著性差异。

在细菌细胞中, 超过 90% 的生物膜基质以三维空间结构存在, 因此, 通过降解生物膜基质是去除生物膜的有效方法^[19], 酶作为一种绿色高效的生物膜抑制剂已被广泛应用于金黄色葡萄球菌、荧光假单胞菌、李斯特氏菌。如采用 β -葡聚糖酶处理可显著抑制荧光假单胞菌生物膜的形成^[20], 采用 Benzonase 处理可使金黄色葡萄球菌生物膜抑制率达 79.80%^[21]。由于生物膜基质包含蛋白质、DNA 和多糖等多种组分, 单一酶降解生物膜有其局限性^[17]。蛋白酶 k 只降解蛋白质类物质、纤维素酶只降解多糖类物质、脂肪酶只降解脂类物质, 本研究在前人研究的基础上采用生物膜降解酶复合, 利用纤维素酶、蛋白酶 k、脂肪酶的交互作用, 打破单一酶降解的局限性, 显著提升了副溶血弧菌生物膜的降解率, 为副溶血弧菌的有效控制提供了理论基础。

2.3 组合酶对 304 不锈钢上生物膜的抑制作用

2.3.1 结晶紫染色与菌落计数

由于副溶血弧菌常常存留在某些食品接触面上, 如聚苯乙烯、食品级不锈钢等, 因此, 复合酶优化的过程是以聚苯乙烯为载体, 为了研究复合酶对副溶血弧菌生物膜在不同载体上的抑制效果, 我们增加了以不锈钢为载体的研究, 结果如图 5 所示, 通过结晶紫染色和菌落计数可以看出, 复合酶处理使 304 不锈钢上副溶血弧菌的生物膜上的细菌数量显著降低, 使生物膜的厚度显著降低。

有研究表明, 生物膜的形成与生物膜内的嵌入细

菌之间存在显著的相关性,林鐸等人发现金黄色葡萄球菌生物膜内的细菌数量随着 Benzonase 酶浓度的升高而降低,而其生物膜的厚度也随之降低^[21]。Melvin 等人发现 0.70 mm 香芹酚可以减少 2.0 lg(CFU/mL) 的沙门氏菌在不锈钢表面的附着,因此得出香芹酚导致细菌附着减少从而形成较弱的生物膜^[22]。Harmsen 等人发现蛋白酶 K 对玻璃片上李斯特菌附着的生物膜没有显著作用^[23],而 Nguyen 等人发现蛋白酶 k 可以显著降低李斯特菌在不锈钢上的附着^[17]。前人的研究表明了抑制细菌在不锈钢上的附着可以抑制细菌在不锈钢上生物膜的形成,在本实验中,复合酶同样可以减少 2.3 lg(CFU/mL) 的副溶血弧菌在不锈钢表面的附着,可以显著的抑制 304 不锈钢上副溶血弧菌的生物膜形成。但由于细菌种类不同,与前人研究结果相比,不同的酶作用效果也不一样,而复合酶降解生物膜基质之外是否还通过其他作用抑制生物膜的形成,这还需进一步研究。

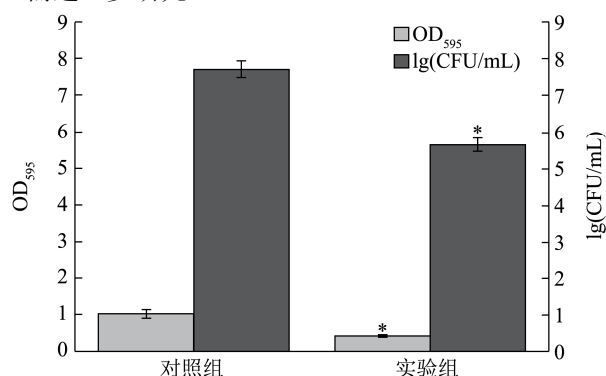


图5 复合酶对 304 不锈钢上副溶血弧菌生物膜的影响

Fig.5 Effects of combined enzyme on the biofilm of *Vibrio parahaemolyticus* on 304 stainless steel

2.3.2 扫描电镜观察

通过扫描电镜,我们可以清楚的看到细菌粘附在不锈钢上的状态及复合酶的抑制效果。如图 6 所示,对照组细菌可以大量黏附在不锈钢上,并形成局部的生物膜(6a),经过复合酶的处理后,只有个别细菌粘附在不锈钢板上,没有形成生物膜(6b)。Cai 等人通过扫描电镜可以清晰的发现,经过酸性电解水处理的荧光假单胞菌生物膜被分离,被分解成小的胞外基质聚集体,胞外基质和细菌黏附数量相比于未处理组显著减少,酸性电解水可以有效的抑制荧光假单胞菌生物膜的形成^[24]。Lekbach 等人通过扫描电镜可以观察到经过丹参提取物处理的在不锈钢上的铜绿假单胞菌生物膜由原来的紧密网状结构变为稀松的小聚集体,并且菌体形态发生变化,内容物外渗,由此发现丹参提取物可能通过作用于细菌的细胞膜从而抑制铜绿假单胞菌在不锈钢生物膜上的形成^[25]。Nguyen 等人通过

扫描电镜图发现,与对照组相比,200 μg/mL 蛋白酶 k 能完全去除李斯特菌在不锈钢上的生物膜^[17],在本实验中,从图 6 可以看出含有蛋白酶 k 的复合酶虽然能有效降低不锈钢上副溶血弧菌的黏附及胞外聚集体的形成,但却不能完全清除生物膜,这可能是由于不同细菌生物膜胞外基质的种类不同,各类基质的含量也不同造成的,这说明,在副溶血弧菌生物膜基质中蛋白质的含量要比李斯特菌含量少,先前已有研究发现 DNA 酶 I 抑制和分散金黄色葡萄球菌生物膜,但对表皮葡萄球菌生物膜无效^[26]。因此,本实验优化得到的复合酶是可以有效降低副溶血弧菌在食品加工器皿上的附着滋生,进一步提升食品安全性。

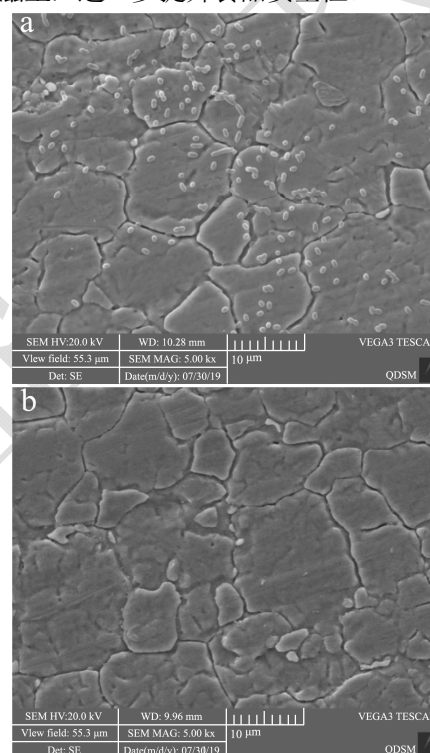


图6 副溶血性弧菌生物膜结构的扫描电镜 (SEM) 图像

Fig.6 The scanning electron microscopy (SEM) images of biofilm structure of *V. parahaemolyticus* incubated enzymes treatment

注: a: 对照组; b: 实验组。

3 结论

本研究通过响应面优化确定纤维素酶、脂肪酶和蛋白酶浓度复合其浓度分别为 1.0 mg/mL、1.1 mg/mL、1.5 mg/mL,在该条件下,复合膜对副溶血弧菌生物膜抑制率可达 89.73%,但载体不同,复合酶的抑制效果不同,其扫描电镜结果进一步证实了抑制效果,这为以生物膜基质为靶点的致病菌控制策略提供了理论依据。

参考文献

- [1] 郑文龙,王卓,马洁等.副溶血性弧菌病原学和分子流行病学流行特征研究进展[J].疾病监测,2015,30(4):337-341
ZHENG Wen-long, WANG Zhuo, MA Jie, et al. Advances in pathogenic and molecular epidemiological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Disease Surveillance, 2015, 30(4): 337-341
- [2] Qin C, Yiquan Z. Structure, function and regulation of the thermostable direct hemolysin (TDH) in pandemic, *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 123: 242-245
- [3] Qiao G, Xu D, Wang Z, et al. Comparison of immune response of pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after multiple and single infections with WSSV and *Vibrio anguillarum* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 44(1): 257-264
- [4] Sarmil M, Tom D, Salwany, et al. Survival and immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following single and concurrent infections with WSSV and *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Aquaculture, 2019, 511: 734227
- [5] 漆坚,程献.浮游态与生物膜态铜绿假单胞菌耐药性分析[J].中华医药感染学杂志,2007,10:1285-1286
QI Jian, CHENG Xian. Resistance analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm ecosystems [J]. Chinese Journal of Infectious Medicine, 2007, 10: 1285-1286
- [6] Berlanga M, Guerrero R. Living together in biofilms: The microbial cell factory and its biotechnological implications [J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 165-169
- [7] Kamjana K, Soowannayan C, Wongprasert K. Ethanolic extract of red seaweed *Gracilaria fisheri* and furanone eradicate *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* biofilms and ameliorate the bacterial infection in shrimp [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 88: 91-101
- [8] Chumporn S, Sasithorn B, Sukanya P, et al. Ginger and its component shogaol inhibit *Vibrio* biofilm formation *in vitro* and orally protect shrimp against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) [J]. Aquaculture, 2019, 504: 139-147
- [9] Gulcan S, Herman W, Wouter L J H, et al. Antifungal and biofilm inhibitory effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil on biofilm forming by *Candida tropicalis* isolates; an *in vitro* study [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2019, 27: 112188
- [10] Freires I A, Buenosilva B, Duarte M C T, et al. The effect of essential oils and bioactive fractions on *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* biofilms: A confocal analysis [J]. Evidence-Based Complementray and Alternative Medicine, 2015, 2015:871316
- [11] Saeki D, Karkhanechi H, Matsuura H, et al. Effect of operating conditions on biofouling in reverse osmosis membrane processes: Bacterial adhesion, biofilm formation, and permeate flux decrease [J]. Desalination, 2016, 378: 74-79
- [12] Hui Huang, Hongqiang Ren, Lili Ding. Aging biofilm from a full-scale moving bed biofilm reactor: Characterization and enzymatic treatment study [J]. Bioresource Technology, 2014, 154: 122-130
- [13] Burton E, Gawande P V, Yakandawala N, et al. Antibiofilm activity of GlmU enzyme inhibitors against catheter-associated uropathogens [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(5): 1835-1840
- [14] Loisel M, Anderson K W. The use of cellulase in inhibiting biofilm formation from organisms commonly found on medical implants [J]. Biofouling, 2003, 19(2): 77-85
- [15] Kalpana B J, Aarthi S, Pandian S K. Antibiofilm activity of α -amylase from *Bacillus subtilis* S8-18 against biofilm forming human bacterial pathogens [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 167(6): 1778-1794
- [16] Zhang L, Koyyalamudi S R, Jeong S C, et al. Immunomodulatory activities of polysaccharides isolated from *Taxillus chinensis* and *Uncaria rhynchophylla* [J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 98(2): 1458-1465
- [17] Nguyen U T, Burrows L L. Dnase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms [J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 187: 26-32
- [18] Lefebvre E, Vighetto C, Di Martino P, et al. Synergistic antibiofilm efficacy of various commercial antiseptics, enzymes and EDTA: A study of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2016, 48(2): 181-188
- [19] Bayram P. Enzyme treated CNF biofilms: Characterization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 117: 713-720